

0111/99

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE UM LODO ANAERÓBIO TERMÓFILO NA BIODEGRADAÇÃO DO COMPOSTO PENTACLOROFENOL (PCP)

SUZY SARZI OLIVEIRA

DEDALUS - Acervo - EESC



31100006894



Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Hidráulica e Saneamento

ORIENTADORA: Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller

Imp. Pg. 21
 Cor. Vermelha
 Tabela Pg. 31
 T. 11/17

São Carlos
1998

Class.	TESE - EESC
Cutt.	3998
Tombo	0111/99

311000006894

1037963

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca - EESC-USP

O48a Oliveira, Suzy Sarzi
Avaliação do potencial de um lodo anaeróbico
termófilo na biodegradação do composto
Pentaclorofenol (PCP) / Suzy Sarzi Oliveira. --
São Carlos, 1998.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia
de São Carlos-Universidade de São Paulo, 1998.
Área: Hidráulica e Saneamento.
Orientador: Profa. Dra. Rosana Filomena
Vazoller.

1. Biodegradação anaeróbia.
2. Termófilos.
3. Pentaclorofenol.
4. Bactérias metanogênicas.
5. Co-cultura. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidata: Licenciada **SUZY SARZI OLIVEIRA**

Dissertação defendida e aprovada em 02.12.98
pela Comissão Julgadora:



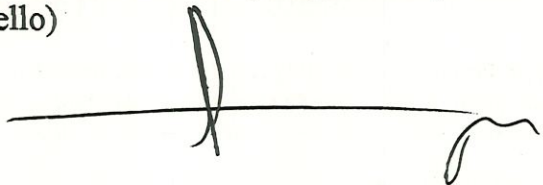
Doutora **ROSANA FILOMENA VAZOLLER (Orientadora) (Pesquisadora)**
(Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo)



Prof. Tit. **EUGENIO FORESTI**
(Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo)



Doutor **GILSON PAULO MANFIO (Pesquisador)**
(Fundação André Tosello)



Prof. Titular **FAZAL HUSSAIN CHAUDHRY**
Coordenador da Área de Hidráulica e Saneamento



JOSÉ CARLOS A. CINTRA
Presidente da Comissão de Pós-Graduação da EESC

REPORT OF RESULTS

Analysis of the data from the 1970 survey is shown below.

The following table shows the percentage of respondents who answered "yes" to each question.

Table 1

Table 1 shows the percentage of respondents who answered "yes" to each question. The data is as follows:

Question 1: 75% answered "yes".

Question 2: 60% answered "yes".

Question 3: 80% answered "yes".

Question 4: 55% answered "yes".

Question 5: 70% answered "yes".

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Pedro e Noemia.

*Aqueles que me deram a vida
e que me encaminharam para o
significado de vivê-la, dedico o
conhecimento desse trabalho.*

The first of these is the
fact that the number of
cases of the disease has
increased in the last few
years.

*“É JUSTAMENTE A POSSIBILIDADE
DE REALIZAR UM SONHO QUE TORNA
A VIDA INTERESSANTE”*

*PAULO COELHO
("O Alquimista")*

*“O HOMEM É O ÚNICO SER NA NATUREZA
QUE TEM CONSCIÊNCIA DE QUE VAI MORRER.
MESMO SABENDO QUE TUDO IRÁ ACABAR,
FAÇAMOS DA VIDA UMA LUTA DIGNA DE UM
SER ETERNO”*

*PAULO COELHO
("O Diário de um Mago")*

É JUSTAMENTE A POSSIBILIDADE
DE REALIZAR UM SONHO QUE TORNA
A VIDA INTERESSANTE.

FRANZ F. COELHO
"O Alquimista"

O SONHO É O ÚNICO SINAL NATURAL
QUE TEM CARACTERÍSTICA DE QUEM O REALIZA.
MESMO SENDO QUE TUDO SE ACABA
PORQUE O ALQUIMISTA É O DIOS DE SUA
PRÓPRIA VIDA.

FRANZ F. COELHO
"O Alquimista"

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo.

Ao meu irmão Richard e à minha cunhada-irmã Adriana, pela confiança, compreensão, carinho e ternura que me trouxeram paz de espírito e alegria indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha irmã Elaine e ao meu cunhado Sérgio que mesmo tão distantes nunca se ausentaram quanto a uma palavra de amor e carinho.

À Profa. Dra. Rosana F. Vazoller, mais do que uma orientadora, uma companheira de reflexões e de construção de novos caminhos e de novos caminhantes.

À bióloga Maria Bernadete Varesche pela importante colaboração profissional e amiga.

À Profa. Elizabeth de Mattos Moraes pela amizade e imenso auxílio nas análises cromatográficas.

A minha mãe, pelo seu exemplo de vida, com minha eterna gratidão.

Ao meu pai, mestre na vida e no trabalho, amigo sempre presente nas alegrias e tristezas.

Ao geólogo Tony C. Dias da Costa que foi capaz de partilhar conhecimentos, angústias, dúvidas e horizontes novos.

A todos os colegas do Laboratório de Processos Anaeróbios pela agradável convivência, em especial ao Werner pelo auxílio na realização da parte gráfica deste trabalho.

Aos professores, funcionários e colegas do SHS/EESC/USP.

Aos colegas de “turma” do mestrado, pelas horas de diversão compartilhadas.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa de estudo concedida.

À Usina São Martinho por gentilmente ceder o material microbiológico usado nos ensaios desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
<i>ABSTRACT</i>.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	8
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	9
3.1. Importância ambiental dos clorofenóis – ênfase ao pentaclorofenol (PCP)..	9
3.2. Interações metabólicas entre bactérias anaeróbias - Associações sintróficas	11
3.3. O co-metabolismo e a degradação do pentaclorofenol.....	21
3.4. Microbiologia da degradação do pentaclorofenol.....	23
3.5. A vida microbiana termófila.....	35
3.5.1. Termoestabilidade das moléculas e das estruturas celulares dos microrganismos anaeróbios termófilos.....	37
3.5.2. Aplicação de microrganismos termófilos na digestão anaeróbia.....	38
3.6. Técnicas empregadas ao estudo de bactérias aneróbias termófilas.....	40
3.6.1. Manipulação das bactérias sob condições de anaerobiose.....	40
3.6.2. Enriquecimento e isolamento das culturas metanogênicas e não metanogênicas.....	44

SUMÁRIO

1	LISTA DE FIGURAS.....	1
2	LISTA DE TABELAS.....	2
3	LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	3
4	RESUMO.....	4
5	ABSTRACT.....	5
6	1. INTRODUÇÃO.....	6
7	2. OBJETIVOS.....	7
8	3. REVISÃO DA LITERATURA.....	8
9	3.1. Impactos ambientais das mudanças climáticas - Emissões de gases de efeito estufa (GEE).....	9
10	3.2. Impactos das mudanças climáticas sobre a saúde humana.....	10
11	3.3. O determinismo e a determinação de fatores ambientais.....	11
12	3.4. Metodologia de desenvolvimento de pesquisas.....	12
13	3.5. A vida humana em transição.....	13
14	3.6. Transição das sociedades modernas para as sociedades sustentáveis.....	14
15	3.7. Ações de organizações internacionais.....	15
16	3.8. Tópicos em pesquisa no campo da saúde ambiental.....	16
17	3.9. Metodologia das pesquisas em saúde ambiental.....	17
18	3.10. Investimento e retorno das futuras pesquisas.....	18
19	4. CONCLUSÃO.....	19

3.6.3. Técnicas microscópicas para a identificação de Archaea metanogênicas e bactérias não-metanogênicas.....	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1. Introdução.....	47
4.2. Equipamentos.....	49
4.2.1. Sistema de distribuição simultânea de gases.....	49
4.2.2. Cromatógrafos.....	51
4.2.3. Vidraria e outros materiais.....	51
4.3. Procedimentos Experimentais.....	52
4.3.1. Inóculo.....	52
4.3.2. Composição e preparação das soluções-estoque e meio basal.....	53
4.3.2.1. Preparação das soluções-estoque de ácidos orgânicos voláteis.....	57
4.3.2.2. Preparação da solução-estoque de pentaclorofenol.....	58
4.3.3. Procedimentos de enriquecimento das culturas bacterianas.....	58
4.3.3.1. Procedimentos de isolamento e identificação das culturas de bactérias metanogênicas e não metanogênicas.....	59
4.4. Procedimentos para as análises cromatográficas.....	61
4.4.1. Metodologia para avaliação dos gases produzidos.....	61
4.4.2. Análises cromatográficas para avaliação do potencial de degradação do composto pentaclorofenol.....	62
4.5. Procedimentos para as análises microscópicas.....	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1. Características do lodo granulado.....	67
5.2. Enriquecimento das culturas bacterianas em substratos orgânicos.....	69
5.2.1. Etapa de enriquecimento.....	69

4.6.3. Técnicas microscópicas para a identificação de vesículas neurogênicas e
 células neuroendócrinas 43

4. MATERIAIS E MÉTODOS 43

4.1. Introdução 47

4.2. Equipamentos 48

4.2.1. Sistema de distribuição manual de gases 48

4.2.2. Comodômetro 51

4.2.3. Vitrinas e outros materiais 51

4.3. Procedimentos Experimentais 52

4.3.1. Injeção 52

4.3.2. Coresção e preparação das lâminas-secas 53

4.3.3. Preparação das lâminas-secas secas 53

4.3.4. Preparação da solução-estufa de pontal 54

4.3.5. Procedimento de exposição do substrato 54

4.3.6. Procedimento de tratamento e identificação dos pontos de fixação
 metálicas e não metálicas 57

4.4. Procedimentos para as análises citológicas 58

4.4.1. Citologia para análise das áreas profundas 58

4.4.2. Análises citológicas para avaliação do pâncreas 58

4.5. Procedimentos para as análises bacteriológicas 64

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 65

5.1. Características do laboratório 65

5.2. Preparação das lâminas-secas com análise citológica 66

5.2.1. Efeito da exposição 66

5.3. Cultura termófila isolada.....	100
6. CONCLUSÕES.....	109
7. RECOMENDAÇÕES.....	110
ANEXO 1 - Cálculo teórico de metano.....	111
ANEXO 2 - Curvas de calibração / Cromatograma típico.....	112
ANEXO 3 - Produção de metano nos ensaios de enriquecimento.....	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
APÊNDICE - Contaminação Ambiental Causada pela RHODIA	

УЧЕБНИК - Справочник учителя и студента

ВВЕДЕНИЕ К РАБОТЕ

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Relações metabólicas no processos de decomposição anaeróbia. Grupos bacterianos aneróbios atuando juntos na conversão da matéria orgânica complexa a metano e dióxido de carbono (adaptado de MADIGAN et al., 1997)..	13
FIGURA 2: Fermentação do etanol a metano e acetato através de uma reação energeticamente desfavorável. Metanogênese, uma reação energeticamente favorável. Acoplamento das reações, exemplo de sintrofismo baseado na transferência de hidrogênio interespecies (MADIGAN et al., 1997).....	14
FIGURA 3: Caminhos de degradação do PCP usados pelo metabolismo microbiano.....	26
FIGURA 4: Exemplos de desalogenação reductiva.....	29
FIGURA 5: Sistema de distribuição simultânea de gases.....	50
FIGURA 6: Fotomicrografia da amostra do lodo anaeróbio termófilo coletado diretamente do biorreator. Pode-se observar células em formatos de bacilos (setas brancas) e cocos dispersos. Exame microscópico sob contraste de fase (objetiva 100, ocular 10 e zoom 1,25).....	68
FIGURA 7 Representação gráfica da curva de produção de metano - Reator ácidos orgânicos voláteis (RAOV1); primeiras 200h. de incubação - Ensaio 1.....	74
FIGURA8: Representação gráfica da curva de produção de metano - Reator ácidos orgânicos voláteis (RAOV2); primeiras 200h. de incubação - Ensaio 1.....	75
FIGURA 9: Representação gráfica da curva de produção de metano - Reator ácidos orgânicos voláteis e PCP (RAOVP3); primeiras 200h. de incubação - Ensaio 1.....	76
FIGURA 10 Representação gráfica da curva de produção de metano - Reator ácidos orgânicos voláteis e PCP (RAOVP4); primeiras 200h. de incubação - Ensaio 1.....	77
FIGURA 11 Representação gráfica da curva de produção de metano - Reator PCP (RP9); primeiras 200h. de incubação - Ensaio 1	78

- FIGURA 1: Relações topológicas no processo de formação das células. Exemplos de relações topológicas simples, como a conversão de um retângulo em um círculo, e a formação de um novo espaço devido ao colapso de um ponto de MÄNDL (2) e (3).
- FIGURA 2: Representação do estado de um sistema em um espaço de fase. A relação entre o estado de um sistema e o espaço de fase é dada por uma transformação invertível. Exemplos de transformações invertíveis são dados em (4) e (5).
- FIGURA 3: Caminho de um sistema em um espaço de fase. O caminho de um sistema em um espaço de fase é determinado por suas condições iniciais e pelas equações de movimento. Exemplos de caminhos em um espaço de fase são dados em (6) e (7).
- FIGURA 4: Exemplos de desintegração relativa. Exemplos de desintegração relativa são dados em (8) e (9).
- FIGURA 5: Sistema de movimento em um espaço de fase. Um sistema de movimento em um espaço de fase é determinado por suas condições iniciais e pelas equações de movimento. Exemplos de sistemas de movimento em um espaço de fase são dados em (10) e (11).
- FIGURA 6: Formas geométricas de um sistema em um espaço de fase. A geometria de um sistema em um espaço de fase é determinada por suas condições iniciais e pelas equações de movimento. Exemplos de formas geométricas em um espaço de fase são dados em (12) e (13).
- FIGURA 7: Representação de um sistema em um espaço de fase. A representação de um sistema em um espaço de fase é determinada por suas condições iniciais e pelas equações de movimento. Exemplos de representações em um espaço de fase são dados em (14) e (15).
- FIGURA 8: Representação de um sistema em um espaço de fase. A representação de um sistema em um espaço de fase é determinada por suas condições iniciais e pelas equações de movimento. Exemplos de representações em um espaço de fase são dados em (16) e (17).
- FIGURA 9: Representação de um sistema em um espaço de fase. A representação de um sistema em um espaço de fase é determinada por suas condições iniciais e pelas equações de movimento. Exemplos de representações em um espaço de fase são dados em (18) e (19).
- FIGURA 10: Representação de um sistema em um espaço de fase. A representação de um sistema em um espaço de fase é determinada por suas condições iniciais e pelas equações de movimento. Exemplos de representações em um espaço de fase são dados em (20) e (21).

FIGURA 12:	Representação gráfica da curva de produção de metano - Reator PCP (RP10); primeiras 200h de incubação -Ensaio 1	79
FIGURA 13:	Representação gráfica da curva de produção de metano - Reator ácidos orgânicos voláteis e PCP (RAOV1); primeiras 200h. de incubação - Ensaio 2.....	84
FIGURA 14:	Representação gráfica da curva de produção de metano - Reator ácidos orgânicos voláteis e PCP (RAOV2); primeiras 200h. de incubação - Ensaio 2.....	85
FIGURA 15:	Representação gráfica da curva de produção de metano - Reator ácidos orgânicos voláteis (RAOV4); primeiras 200h. de incubação - Ensaio 2.....	86
FIGURA 16:	Representação gráfica da curva de produção de metano - Reator PCP (RP5); primeiras 200h. de incubação - Ensaio 2	87
FIGURA 17:	Representação gráfica da curva de produção de metano - Reator PCP (RP6); primeiras 200h. de incubação - Ensaio 2	88
FIGURA 18:	Representação gráfica da curva de produção de metano - Reator ácidos orgânicos voláteis e PCP (RAOV1); primeiras 200h. de incubação - Ensaio 3.....	92
FIGURA 19:	Representação gráfica da curva de produção de metano - Reator ácidos orgânicos voláteis (RAOV3); primeiras 200h. de incubação - Ensaio 3.....	93
FIGURA 20:	Representação gráfica da curva de produção de metano - Reator ácidos orgânicos voláteis e sulfato de sódio (RAOVSO ₄ ²⁻); primeiras 200h. de incubação - Ensaio 3.....	94
FIGURA 21:	Fotomicrografia da amostra do Ensaio 3, enriquecimento em AOV e sulfato de sódio. As setas mostram bacilos fluorescentes. Observam-se também em todo o campo cocos dispersos com fluorescência “palha”. Microscopia de fluorescência: objetiva 100, ocular 10 e zoom 1,25. Tempo de incubação: 19 dias, 55±2°C, agitação:175 rpm.....	97
FIGURA 22:	Fotomicrografia da amostra do Ensaio 3, enriquecimento em AOV e sulfato de sódio. As setas mostram bacilos de diversos tamanhos. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100, ocular 10 e zoom 1,25. Tempo de incubação: 19 dias, 55±2°C, agitação:175 rpm.....	98

- FIGURA 13: Representația grafică a curbei de distribuție a numărului de copii în rândul elevilor din învățământul primar în anul școlar 2006-2007. (Sursa: Direcția Județeană de Statistică Iași, 2007)
- FIGURA 14: Reprezentarea grafică a curbei de distribuție a numărului de copii în rândul elevilor din învățământul primar în anul școlar 2006-2007. (Sursa: Direcția Județeană de Statistică Iași, 2007)
- FIGURA 15: Reprezentarea grafică a curbei de distribuție a numărului de copii în rândul elevilor din învățământul primar în anul școlar 2006-2007. (Sursa: Direcția Județeană de Statistică Iași, 2007)
- FIGURA 16: Reprezentarea grafică a curbei de distribuție a numărului de copii în rândul elevilor din învățământul primar în anul școlar 2006-2007. (Sursa: Direcția Județeană de Statistică Iași, 2007)
- FIGURA 17: Reprezentarea grafică a curbei de distribuție a numărului de copii în rândul elevilor din învățământul primar în anul școlar 2006-2007. (Sursa: Direcția Județeană de Statistică Iași, 2007)
- FIGURA 18: Reprezentarea grafică a curbei de distribuție a numărului de copii în rândul elevilor din învățământul primar în anul școlar 2006-2007. (Sursa: Direcția Județeană de Statistică Iași, 2007)
- FIGURA 19: Reprezentarea grafică a curbei de distribuție a numărului de copii în rândul elevilor din învățământul primar în anul școlar 2006-2007. (Sursa: Direcția Județeană de Statistică Iași, 2007)
- FIGURA 20: Reprezentarea grafică a curbei de distribuție a numărului de copii în rândul elevilor din învățământul primar în anul școlar 2006-2007. (Sursa: Direcția Județeană de Statistică Iași, 2007)
- FIGURA 21: Fotomontajul de distribuție a numărului de copii în rândul elevilor din învățământul primar în anul școlar 2006-2007. (Sursa: Direcția Județeană de Statistică Iași, 2007)
- FIGURA 22: Fotomontajul de distribuție a numărului de copii în rândul elevilor din învățământul primar în anul școlar 2006-2007. (Sursa: Direcția Județeană de Statistică Iași, 2007)

FIGURA 23 e 24:	Fotomicrografia da amostra do Ensaio 3. Aspectos das sarcinas no enriquecimento em AOV. Tempo de incubação: 32 dias, $55\pm 2^{\circ}\text{C}$, agitação:175rpm. Microscopia de contraste de fase (Figura 23) e fluorescência (Figura 24): objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25.....	98
FIGURA 25:	Fotomicrografia da amostra do Ensaio 3. Aspectos das sarcinas (seta branca) no enriquecimento em AOV e PCP. Tempo de incubação: 32 dias, $55\pm 2^{\circ}\text{C}$, agitação:175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25.....	99
FIGURA 26	Fotomicrografia da amostra do Ensaio 3. Aspectos das sarcinas (setas azuis) e dos bacilos (setas brancas) no enriquecimento em AOV e PCP. Tempo de incubação: 32 dias, $55\pm 2^{\circ}\text{C}$, agitação:175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25.....	99
FIGURA 27:	Fotomicrografia da amostra do Ensaio 3. Aspectos das sarcinas (setas azuis) e dos bacilos (setas brancas) no enriquecimento em AOV e PCP. Tempo de incubação: 32 dias, $55\pm 2^{\circ}\text{C}$, agitação:175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25.....	99
FIGURA 28 e 29:	Aspectos da co-cultura de bacilos. Ensaio de isolamento, enriquecimento em AOV e PCP. Tempo de incubação: 12 dias, $55\pm 2^{\circ}\text{C}$, agitação:175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25.....	103
FIGURA 30 e 31	Aspectos dos tipos morfológicos encontrados no Ensaio de isolamento no enriquecimento em AOV e PCP. As setas brancas mostram sarcinas pouco desenvolvidas (Figura 30). A Figura 31 mostra os tipos morfológicos através da microscopia de fluorescência. Tempo de incubação: 10 dias, $55\pm 2^{\circ}\text{C}$, agitação:175rpm. Microscopia de contraste de fase (Figura 30) e fluorescência (Figura 31): objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25.....	103
FIGURA 32:	Aspecto do aglomerado de bacilos. Enriquecimento: AOV e PCP. Tempo de incubação: 12 dias, $55\pm 2^{\circ}\text{C}$, agitação:175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25.....	104
FIGURA 33	Aspectos das células em formato de sarcinas (setas brancas) e em formato de bacilos (aglomerado). Enriquecimento:	

- FIGURA 29
e 30
Fotomicrografia da amostra de Farnesol 2, reportada em
anterior (esta amostra) no empacotamento em AOV. Tempo de incubação
32 dias, 55±1°C, agitação 175 rpm. Abertura do objetivo de
100x, campo de visão 1,25 mm.
- FIGURA 31
Fotomicrografia da amostra de Farnesol 2, reportada em
anterior (esta amostra) no empacotamento em AOV e PCR. Tempo de incubação 32
dias, 55±1°C, agitação 175 rpm. Abertura do objetivo de
100x, campo de visão 1,25 mm.
- FIGURA 32
Fotomicrografia da amostra de Farnesol 2, reportada em
anterior (esta amostra) no empacotamento em AOV e PCR. Tempo de incubação 32
dias, 55±1°C, agitação 175 rpm. Abertura do objetivo de
100x, campo de visão 1,25 mm.
- FIGURA 33
Fotomicrografia da amostra de Farnesol 2, reportada em
anterior (esta amostra) no empacotamento em AOV e PCR. Tempo de incubação 32
dias, 55±1°C, agitação 175 rpm. Abertura do objetivo de
100x, campo de visão 1,25 mm.
- FIGURA 34
Aspectos da estrutura de células de levedura em empacotamento
em AOV e PCR. Tempo de incubação 32 dias, 55±1°C, agitação 175 rpm. Abertura do
objetivo 100x, campo de visão 1,25 mm.
- FIGURA 35
Aspectos dos tipos morfológicos de células de levedura em
empacotamento em AOV e PCR. Tempo de incubação 32 dias, 55±1°C, agitação 175 rpm.
Abertura do objetivo 100x, campo de visão 1,25 mm.
- FIGURA 36
Aspectos da estrutura de células de levedura em empacotamento em AOV e PCR. Tempo de incubação 32 dias, 55±1°C, agitação 175 rpm. Abertura do objetivo 100x, campo de visão 1,25 mm.
- FIGURA 37
Aspectos da estrutura de células de levedura em empacotamento em AOV e PCR. Tempo de incubação 32 dias, 55±1°C, agitação 175 rpm. Abertura do objetivo 100x, campo de visão 1,25 mm.
- FIGURA 38
Aspectos das células em formação de levedura em empacotamento em AOV e PCR. Tempo de incubação 32 dias, 55±1°C, agitação 175 rpm. Abertura do objetivo 100x, campo de visão 1,25 mm.

	AOV e PCP. Tempo de incubação: 22 dias, 55±2°C, agitação:175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25.....	104
FIGURA 34 e 35:	Aspectos dos filamentos originados possivelmente dos bacilos maiores da co-cultura de bacilos (ensaio de isolamento). Enriquecimento: AOV e PCP. Tempo de incubação: 16 dias, 55±2°C, agitação:175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25.....	104
FIGURA 36:	Aspectos da co-cultura de bacilos. Ensaio de isolamento. Enriquecimento: AOV e PCP. 55±2°C, agitação:175rpm. Microscopia de varredura.....	105
FIGURA 37:	Aspecto de alguns bacilos da co-cultura juntamente com <i>Methanosarcina</i> sp. Ensaio de isolamento. Enriquecimento: AOV e PCP, 55±2°C, agitação:175rpm. Microscopia de varredura.....	105
FIGURA 38 e 39:	Destaque das células em formato de sarcinas. Enriquecimento: AOV. Tempo de incubação: 13 dias, 55±2°C, agitação:175rpm. Microscopia de contraste de fase (Figura 38) e fluorescência (Figura 39): objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25.....	106
FIGURA 40:	Destaque das células em formato de sarcinas, rompimento das “bolsas” que contém as células. Enriquecimento: AOV. Tempo de incubação: 13 dias, 55±2°C, agitação:175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25.....	107
FIGURA 41:	Destaque das células em formato de sarcinas. Enriquecimento: AOV. Tempo de incubação: 13 dias, 55±2°C, agitação:175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25.....	107
FIGURA 42:	Aspecto dos bacilos. Enriquecimento: AOV. Tempo de incubação: 13 dias, 55±2°C, agitação:175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25.....	107
FIGURA 43:	Células em formato de sarcinas (<i>Methanosarcina</i> sp). Enriquecimento: AOV. Microscopia de varredura. Aumento de 10.000 vezes.....	108
FIGURA 44:	Células em formato de sarcinas (<i>Methanosarcina</i> sp) Enriquecimento: AOV. Microscopia de varredura. Aumento de 2.000 vezes.....	108

Aspectos de las células en formación de la corteza en el embrión de *Aplysia* (Figura 34). Microscopio electrónico de transmisión. 104

FIGURA 34

Aspectos de las células en formación de la corteza en el embrión de *Aplysia* (Figura 35). Microscopio electrónico de transmisión. 104

FIGURA 35

Aspectos de las células en formación de la corteza en el embrión de *Aplysia* (Figura 36). Microscopio electrónico de transmisión. 104

FIGURA 36

Aspectos de las células en formación de la corteza en el embrión de *Aplysia* (Figura 37). Microscopio electrónico de transmisión. 104

FIGURA 37

Aspectos de las células en formación de la corteza en el embrión de *Aplysia* (Figura 38). Microscopio electrónico de transmisión. 104

FIGURA 38

Aspectos de las células en formación de la corteza en el embrión de *Aplysia* (Figura 39). Microscopio electrónico de transmisión. 104

FIGURA 39

Aspectos de las células en formación de la corteza en el embrión de *Aplysia* (Figura 40). Microscopio electrónico de transmisión. 104

FIGURA 40

Aspectos de las células en formación de la corteza en el embrión de *Aplysia* (Figura 41). Microscopio electrónico de transmisión. 104

FIGURA 41

Aspectos de las células en formación de la corteza en el embrión de *Aplysia* (Figura 42). Microscopio electrónico de transmisión. 104

FIGURA 45	Células em formato de bacilos (co-cultura). Enriquecimento: AOV. Microscopia de varredura. Aumento de 10.000 vezes.....	108
FIGURA 46:	Curva de calibração para o gás metano.....	112
FIGURA 47	Curva de calibração para o PCP.....	112
FIGURA 48:	Curva de calibração para o TCP.....	113
FIGURA 49	Curva de calibração para o DCP.....	113
FIGURA 50	Cromatograma típico para análise dos compostos PCP, TCP e DCP.....	114

100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1: Persistência de herbicidas e inseticidas nos solos.....	3
TABELA 2: Reações postuladas para a metanogênese bacteriana termófila do acetato através da ação da cocultura isolada por ZINDER & KOCH (1984), e as variações de energia livre padrão (25°C).....	17
TABELA 3: Leitura dos testes para verificação do crescimento da cultura 1 em diferentes substratos orgânicos.....	19
TABELA 4: Leitura dos testes para a verificação do crescimento da cultura 2 em diferentes substratos orgânicos.....	20
TABELA 5: Leitura dos testes para verificação do crescimento da cultura metanogênica em formato de sarcinas em diferentes temperaturas.....	20
TABELA 6: Características dos gêneros de bactérias capazes de desalogenar redutivamente.....	31
TABELA 7: Concentrações dos ácidos orgânicos voláteis de algumas plantas de biogás dinamarquesas, em escala industrial.....	39
TABELA 8: Condições das culturas anaeróbias enriquecidas em PCP a 55±2°C	49
TABELA 9: Composição do meio basal ZINDER.....	53
TABELA 10: Composição da solução traço de metais - meio ZINDER.....	55
TABELA 11: Concentração das soluções-estoque e volumes adicionados nos reatores.....	55
TABELA 12: Concentração das soluções-estoque e volumes adicionados nos tubos Bellco®.....	56
TABELA 13: Composição da solução de vitaminas.....	57
TABELA 14: Condições dos ensaios de enriquecimento.....	70
TABELA 15: Valores de metano obtidos durante o Ensaio 1 - reator AOV1, primeiras 200 h. de incubação, a 55±2°C.....	73

LISTA DE TABELAS

Índice

TABELA 1: Persistência de herbívoros e insetos em plantas de *Phaseolus vulgaris* L. 10

TABELA 2: Respostas populacionais para a parasitização de *Phaseolus vulgaris* L. por *Trioxys* sp. (Hymenoptera: Braconidae) em função da presença de insetos herbívoros. 15

TABELA 3: Letalidade dos parasitas para herbívoros de diferentes espécies de culturas. 18

TABELA 4: Letalidade dos parasitas para a verificação de crescimento de culturas. 20

TABELA 5: Letalidade dos parasitas para verificação de crescimento de culturas em diferentes condições de manejo. 22

TABELA 6: Características das plantas de *Phaseolus vulgaris* L. 25

TABELA 7: Concentração dos parasitas em plantas de *Phaseolus vulgaris* L. 28

TABELA 8: Condições de cultivo e manejo de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. 30

TABELA 9: Características de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. 32

TABELA 10: Composição da colônia de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. 35

TABELA 11: Características das plantas de *Phaseolus vulgaris* L. 38

TABELA 12: Características das plantas de *Phaseolus vulgaris* L. 40

TABELA 13: Características das plantas de *Phaseolus vulgaris* L. 42

TABELA 14: Características das plantas de *Phaseolus vulgaris* L. 45

TABELA 15: Características das plantas de *Phaseolus vulgaris* L. 48

TABELA 16:	Valores de metano obtidos durante o Ensaio 1 - reator AOV2, primeiras 200 h. de incubação, a $55\pm 2^{\circ}\text{C}$	74
TABELA 17:	Valores de metano obtidos durante o Ensaio 1 - reator AOV3, primeiras 200 h. de incubação, a $55\pm 2^{\circ}\text{C}$	75
TABELA 18:	Valores de metano obtidos durante o Ensaio 1 - reator AOV4, primeiras 200 h. de incubação, a $55\pm 2^{\circ}\text{C}$	76
TABELA 19:	Valores de metano obtidos durante o Ensaio 1 - reator AOV1, primeiras 200 h. de incubação, a $55\pm 2^{\circ}\text{C}$	77
TABELA 20:	Valores de metano obtidos durante o Ensaio 1 - reator P10, primeiras 200 h. de incubação, a $55\pm 2^{\circ}\text{C}$	78
TABELA 21:	Valores de AME para o Ensaio 1.....	79
TABELA 22:	Remoção de pentaclorofenol durante o primeiro ensaio de enriquecimento.....	80
TABELA 23:	Valores de metano obtidos durante o Ensaio 2 - reator AOV1, 125 h. de incubação, a $55\pm 2^{\circ}\text{C}$	83
TABELA 24:	Valores de metano obtidos durante o Ensaio 2 - reator AOV2, 125 h. de incubação, a $55\pm 2^{\circ}\text{C}$	84
TABELA 25:	Valores de metano obtidos durante o Ensaio 2 - reator AOV4, 125 h. de incubação, a $55\pm 2^{\circ}\text{C}$	85
TABELA 26:	Valores de metano obtidos durante o Ensaio 2 - reator P5, 125 h. de incubação, a $55\pm 2^{\circ}\text{C}$	86
TABELA 27:	Valores de metano obtidos durante o Ensaio 2 - reator P6, 125 h. de incubação, a $55\pm 2^{\circ}\text{C}$	87
TABELA 28:	Remoção de pentaclorofenol durante o segundo ensaio de enriquecimento.....	88
TABELA 29	Valores de AME para o Ensaio 2.....	91
TABELA 30	Valores de metano obtidos durante o Ensaio 3 - reator AOV1, 460 h. de incubação, a $55\pm 2^{\circ}\text{C}$	92
TABELA 31	Valores de metano obtidos durante o Ensaio 3 - reator AOV3, 460 h. de incubação, a $55\pm 2^{\circ}\text{C}$	93

TABELA 14 - Valores de metais pesados durante o Período 1 - total AOV1, período 200 h de incubação a 25°C.

TABELA 15 - Valores de metais pesados durante o Período 1 - total AOV2, período 200 h de incubação a 25°C.

TABELA 16 - Valores de metais pesados durante o Período 1 - total AOV4, período 200 h de incubação a 25°C.

TABELA 17 - Valores de metais pesados durante o Período 1 - total AOV1, período 200 h de incubação a 25°C.

TABELA 18 - Valores de metais pesados durante o Período 1 - total AOV2, período 200 h de incubação a 25°C.

TABELA 19 - Valores de metais pesados durante o Período 1 - total AOV4, período 200 h de incubação a 25°C.

TABELA 20 - Remoção de metais pesados durante o Período 1 - total AOV1, período 200 h de incubação a 25°C.

TABELA 21 - Valores de metais pesados durante o Período 2 - total AOV1, período 200 h de incubação a 25°C.

TABELA 22 - Valores de metais pesados durante o Período 2 - total AOV2, período 200 h de incubação a 25°C.

TABELA 23 - Valores de metais pesados durante o Período 2 - total AOV4, período 200 h de incubação a 25°C.

TABELA 24 - Valores de metais pesados durante o Período 2 - total AOV1, período 200 h de incubação a 25°C.

TABELA 25 - Valores de metais pesados durante o Período 2 - total AOV2, período 200 h de incubação a 25°C.

TABELA 26 - Remoção de metais pesados durante o Período 2 - total AOV1, período 200 h de incubação a 25°C.

TABELA 27 - Valores de metais pesados durante o Período 2 - total AOV1, período 200 h de incubação a 25°C.

TABELA 28 - Valores de metais pesados durante o Período 2 - total AOV2, período 200 h de incubação a 25°C.

TABELA 29 - Valores de metais pesados durante o Período 2 - total AOV4, período 200 h de incubação a 25°C.

TABELA 32	Valores de metano obtidos durante o Ensaio 3 - reator RSO ₄ ⁻² , 460 h. de incubação, a 55±2°C.....	94
TABELA 33	Valores de AME para o Ensaio 3.....	95
TABELA 34	Remoção de pentaclorofenol no terceiro ensaio de enriquecimento, a 55±2°C.....	96
TABELA 35	Produção de metano - primeiras 200h. de incubação. Reator ácidos orgânicos voláteis (RAOV1). Ensaio 1 (enriquecimento).....	115
TABELA 36	Produção de metano - primeiras 200h. de incubação. Reator ácidos orgânicos voláteis (RAOV2). Ensaio 1 (enriquecimento).....	115
TABELA 37	Produção de metano - primeiras 200h. de incubação. Reator ácidos orgânicos voláteis e PCP (RAOVP3). Ensaio 1 (enriquecimento).....	115
TABELA 38	Produção de metano - primeiras 200h. de incubação Reator ácidos orgânicos voláteis e PCP (RAOVP4). Ensaio 1 (enriquecimento).....	116
TABELA 39	Produção de metano - primeiras 200h. de incubação. Reator glicose (RG5). Ensaio 1 (enriquecimento).....	116
TABELA 40	Produção de metano - primeiras 200h. de incubação. Reator glicose (RG6). Ensaio 1 (enriquecimento).....	116
TABELA 41	Produção de metano - primeiras 200h. de incubação. Reator glicose e PCP (RGP7). Ensaio 1 (enriquecimento).....	117
TABELA 42	Produção de metano - primeiras 200h. de incubação. Reator glicose e PCP (RGP8). Ensaio 1 (enriquecimento).....	117
TABELA 43	Produção de metano - primeiras 200h. de incubação. Reator PCP (RP9). Ensaio 1 (enriquecimento).....	117
TABELA 44	Produção de metano - primeiras 200h. de incubação. Reator PCP (RP10). Ensaio 1 (enriquecimento).....	118
TABELA 45	Produção de metano - 130h. de incubação. Reator ácidos orgânicos voláteis e PCP (RAOVP1). Ensaio 2 (enriquecimento).....	118

TABELA 46	Produção de metano - 130h. de incubação. Reator ácidos orgânicos voláteis e PCP (RAOVP2). Ensaio 2 (enriquecimento).....	118
TABELA 47	Produção de metano - 130h. de incubação. Reator ácidos orgânicos voláteis (RAOV3). Ensaio 2 (enriquecimento).....	118
TABELA 48	Produção de metano - 130h. de incubação. Reator ácidos orgânicos voláteis (RAOV4). Ensaio 2 (enriquecimento).....	119
TABELA 49	Produção de metano - 130h. de incubação. Reator PCP (RP5). Ensaio 2 (enriquecimento).....	119
TABELA 50	Produção de metano - 130h. de incubação. Reator PCP (RP6). Ensaio 2 (enriquecimento).....	119
TABELA 51	Produção de metano - 460h. de incubação. Reator ácidos orgânicos voláteis e PCP (RAOVP1). Ensaio 3 (enriquecimento).....	120
TABELA 52	Produção de metano - 460h. de incubação. Reator ácidos orgânicos voláteis e PCP (RAOVP2). Ensaio 3 (enriquecimento).....	120
TABELA 53	Produção de metano - 460h. de incubação. Reator ácidos orgânicos voláteis (RAOV3). Ensaio 3 (enriquecimento).....	121
TABELA 54	Produção de metano - 460h. de incubação. Reator ácidos orgânicos voláteis e sulfato de sódio (RAOVSO ₄ ²⁻). Ensaio 3 (enriquecimento).....	122

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Ø - diâmetro

µM - micromol

AM - atividade metanogênica

AME - atividade metanogênica específica

AOV - ácidos orgânicos voláteis

ATP - adenosina trifosfato

CH₄/gSSV.h. - metano/grama de sólidos suspensos voláteis. hora

CG - cromatografia gasosa

CNTP - condições normais de temperatura e pressão

DCP - diclorofenol

DQO - demanda química de oxigênio

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

LPA - Laboratório de Processos Anaeróbios

MCPs - monoclorofenóis

PCBs - bifenilos policlorados

PCP - pentaclorofenol

pH - potencial hidrogeniônico

psi - unidade de pressão

RAOV - reator ácidos orgânicos voláteis

RAOVP - reator ácidos orgânicos voláteis e PCP

RG - reator glicose

RGP - reator glicose e PCP

RP - reator PCP

RSO₄⁻² - reator sulfato

SSV - sólidos suspensos voláteis

TCP - triclorofenol

TeCP - tetraclorofenol

UASB - reator de fluxo ascendente e manta de lodo

[The text in this block is extremely faint and illegible. It appears to be a dense block of handwritten or typed text, possibly a list or a series of paragraphs, but the characters are too light to transcribe accurately.]

RESUMO

OLIVEIRA, S.S. (1998). Avaliação do potencial de um lodo anaeróbio termófilo na degradação do composto pentaclorofenol (PCP). São Carlos, 1998. 130p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

A presente Dissertação de Mestrado aborda o estudo do potencial do uso de um lodo granulado anaeróbio na degradação do composto pentaclorofenol (PCP), lodo esse proveniente de um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) operado sob condições termofílicas ($55\pm 2^{\circ}\text{C}$) para o tratamento de vinhaça. O consórcio microbiano granulado foi estudado sob condições de anaerobiose estrita, com o objetivo primordial de enriquecer culturas de bactérias anaeróbias em meio específico contendo PCP e avaliar a biodegradação termófila do PCP sob condições metanogênicas. Três ensaios para o enriquecimento do lodo granulado foram realizados em meio mineral acrescido de fontes orgânicas, tais como; ácidos acético, propiônico e butírico, glicose e etanol. O PCP foi estudado na concentração de 2,5 mg/L, sempre adicionado ao meio em solução de etanol. Os resultados mostraram a capacidade do lodo termófilo enriquecido na degradação do PCP. Aproximadamente 100% do composto foi removido na presença dos ácidos orgânicos voláteis, e cerca de 80% quando do emprego da glicose. Porcentagem elevada de degradação também foi verificada quando apenas etanol e o organohalogenado estiveram presentes no meio. Os maiores valores de metano foram obtidos nos ensaios contendo somente ácidos orgânicos voláteis, e naqueles contendo os ácidos, etanol e PCP. Os valores calculados de atividade metanogênica específica para os lodos granulados durante o enriquecimento contendo ácidos orgânicos voláteis, etanol e PCP estiveram próximos, em geral, a 0,06 mmoles CH_4 /gSSV.h. Os resultados de remoção de PCP foram obtidos nos ensaios de enriquecimento com duração de até 19 dias de incubação, a $55\pm 2^{\circ}\text{C}$. No entanto, o ensaio 2 com duração de 7 dias, revelou que nas condições estudadas é provável que cerca de 50% do PCP seja removido nesse período, na presença de ácidos orgânicos e etanol, ou apenas etanol. A diluição da amostra enriquecida em meio mineral contendo ácidos orgânicos, etanol e PCP resultou na obtenção de uma co-cultura com bacilos de tamanhos diferentes, sendo um fluorescente, relacionado ao gênero *Methanobacterium* uma Archaea metanogênica hidrogenotrófica e um bacilo não fluorescente. Os exames microscópicos também indicaram a presença de organismos do gênero *Methanosarcina* nas condições de cultivo citadas. O pentaclorofenol também foi removido do meio durante os estudos com a co-cultura. As análises cromatográficas do PCP nos ensaios de enriquecimento e de obtenção de culturas revelaram a presença de dois compostos intermediários no meio: o diclorofenol (DCP) e o triclorofenol (TCP).

palavras-chave: biodegradação anaeróbia, termófilos, pentaclorofenol, bactérias metanogênicas, co-cultura.

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. This is essential for ensuring the integrity of the financial statements and for providing a clear audit trail. The records should be kept up-to-date and should be easily accessible to all relevant parties.

2. The second part of the document outlines the procedures for handling discrepancies. It is important to identify any differences between the recorded amounts and the actual amounts as soon as possible. Once a discrepancy is identified, the responsible party should investigate the cause and take appropriate action to correct the error.

3. The third part of the document describes the process for reconciling the accounts. This involves comparing the recorded amounts with the actual amounts and identifying any differences. The reconciliation process should be completed on a regular basis to ensure that the accounts are accurate and up-to-date.

4. The fourth part of the document discusses the importance of maintaining proper documentation. All transactions should be supported by appropriate evidence, such as invoices, receipts, and bank statements. This documentation is essential for providing a clear audit trail and for ensuring the accuracy of the financial statements.

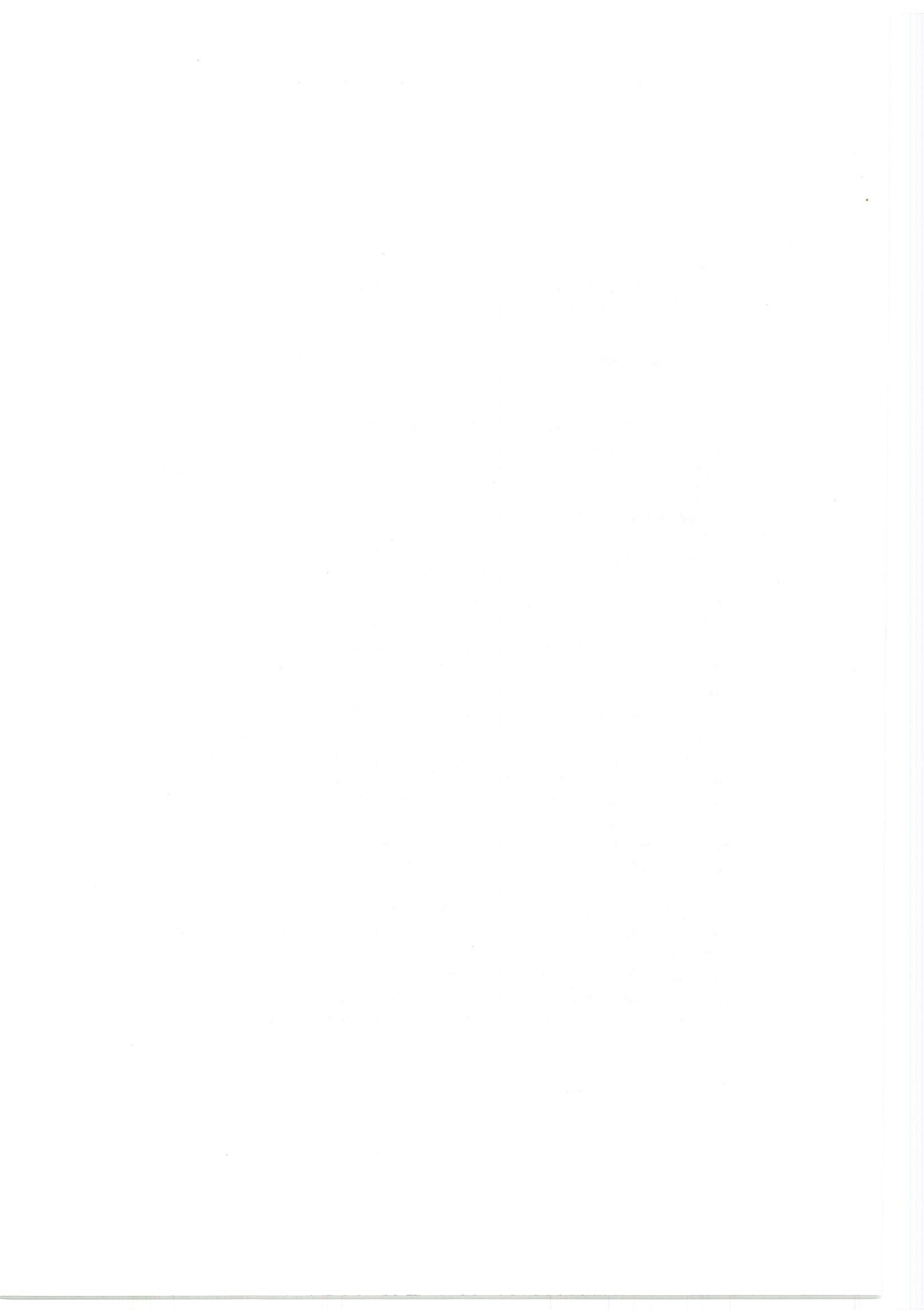
5. The fifth part of the document outlines the responsibilities of the various parties involved in the financial reporting process. It is the responsibility of the management to ensure that the financial statements are accurate and complete. The auditors are responsible for providing an independent opinion on the financial statements. The board of directors is responsible for overseeing the financial reporting process and for ensuring that the financial statements are presented fairly and accurately.

ABSTRACT

Oliveira, S.S.(1998). Evaluation of the potential of an anaerobic thermophilic sludge in the biodegradation of compound pentachlorophenol (PCP). São Carlos, 1998. 130 p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

The present study deals the evaluation of the potential of using an anaerobic granular sludge in the degradation of pentachlorophenol (PCP), originated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) operated under thermophilic conditions (55 ± 2 °C) for the vinasse treatment. The granular microbial interactions were studied under strict anaerobic conditions, aiming to enrich cultures of anaerobic bacteria in a specific environment containing PCP, and to evaluate the thermophilic biodegradation of PCP under methanogenic conditions. Three experiments for the enrichment of the granular sludge were carried out in a mineral environment containing organic sources, such as acetic, propionic and butyric acids, glucose and ethanol. PCP was studied at the concentration of 2.5 mg/L, always diluted in ethanol. The results showed the capacity of enriched thermophilic sludge to degrade PCP. Almost 100% and approximately 80% of the compound were removed in the presence of organic volatile fatty acids and glucose, respectively. A high degradation percentage was also verified when only ethanol and organohalogenated were present in the environment. The highest values of methane were obtained in the experiments with only volatile fatty acids, and in those containing the acids, ethanol and PCP. The specific methanogenic activity for granular sludge during the enrichment containing the volatile fatty acids, ethanol and PCP was estimated in 0.06 mmoles $\text{CH}_4/\text{gSSV.h}$. The results of PCP removal were obtained in the enrichment experiments with duration of up to 19 days of incubation, at 55 ± 2 °C. Nevertheless, the second experiment, with duration of 7 days, showed that under the experimental conditions, approximately 50% of PCP can be removed, in the presence of organic acids and ethanol, or only ethanol. The dilution of the enriched sample in mineral environment containing organic acids, ethanol and PCP resulted in a coculture with two rods of different sizes, one of them fluorescent, related to the *Methanobacterium* sp, a hydrogenotrophic methanogenic Archaea, and other no fluorescent organism. The microscopic tests also indicated the presence of *Methanosarcina* sp in the cultivating conditions mentioned above. PCP was also removed during the experiments conducted with the coculture. The chromatographic analyses of PCP compound in the enrichment experiments and the generation of cultures showed the presence of intermediary compounds: dichlorophenol (DCP) and trichlorophenol (TCP) in the media.

Keywords: anaerobic biodegradation, thermophilic sludge, pentachlorophenol, methanogenic bacteria, coculture.



1 - INTRODUÇÃO

Os processos biológicos de tratamento de rejeitos incorporam uma variedade de espécies microbianas e, portanto, grande versatilidade metabólica, verificando-se, por exemplo, bactérias capazes de degradar compostos complexos e artificialmente sintetizados pelas indústrias, como também bactérias que degradam apenas moléculas orgânicas tão simples quanto o ácido acético, e produzem um poderoso combustível, o gás metano. Os resultados da ação microbiana possibilitam modificações estruturais de um determinado composto, promovendo a redução ou eliminação de sua toxicidade, ou ainda, proporcionando a sua total mineralização. A vantagem no uso de microrganismos para degradar os poluentes está no baixo custo e alta eficiência dos sistemas biológicos de tratamento (VAZOLLER, 1995).

O processo biológico de tratamento de rejeitos por digestão anaeróbia ocorre na ausência de oxigênio molecular, no qual populações bacterianas interagem para promover a fermentação estável e auto-regulada da matéria orgânica, que resulta, principalmente, na produção dos gases metano e dióxido de carbono (MOSEY¹ *apud* FORESTI, 1994).

Os sistemas anaeróbios de tratamento possuem algumas vantagens sobre os sistemas aeróbios (VAZOLLER, 1995). De acordo com citações feitas pelo autor, as principais vantagens dos processos anaeróbios são:

- baixo consumo de energia, por não exigir a introdução forçada de oxigênio no meio.

¹ MOSEY, F. E. (1982). New developments in the anaerobic treatment of industrial wastes. *Wat. Pollut. Control*, v.81, n.4. p.540-552 *apud* FORESTI, E. (1994). Fundamentos do processo de digestão anaeróbia. In: TRATAMIENTO anaeróbio. Montividéo, Uruguai, p.97-110.

- baixa produção de lodo, estimada como sendo inferior a 20% daquela apresentada nos processos aeróbios;

- possibilidade de recuperação e utilização do gás metano como combustível.

Nos processos de biodegradação anaeróbia, desenvolvem-se espécies bacterianas capazes de degradar compostos orgânicos e tóxicos. Tais bactérias podem ser encontradas em diversos habitats, como solo, sedimentos aquáticos, lodo de esgotos, fezes de animais, trato digestivo de ruminantes e nos biorreatores para o tratamento de resíduos, operados sob condições anaeróbias.

Nos processos anaeróbios, a degradação da matéria orgânica ocorre pela atuação de microrganismos procarióticos anaeróbios facultativos e obrigatórios e as atividades metabólicas consistem basicamente da respiração e da fermentação anaeróbias (VAZOLLER, 1995).

As tecnologias sanitárias que empregam a atividade microbiana anaeróbia podem ser limitadas pela presença de um composto químico recalcitrante. DAMIANOVIC (1997), definiu que um composto pode ser considerado recalcitrante no processo anaeróbio (biorreatores de leito fluidificado, de contato e UASB), quando não for transformado microbiologicamente em período de horas. Em sistemas naturais, com tempos de detenção menos definidos, um composto é considerado refratário se resiste à biodegradação por meses ou anos.

Segundo HOLLIGER *et al.* (1988), um grande número de compostos xenobióticos estão sujeitos ao ataque microbiano, sendo a degradação microbiana controlada, uma alternativa tecnológica para a transformação de compostos tóxicos xenobióticos. De acordo com a definição apresentada por MADIGAN *et al.* (1997), xenobiótico é um produto totalmente sintético não encontrado na natureza. Dentre esses compostos largamente distribuídos no ambiente como resíduos, destacam-se os pesticidas, os quais são considerados tóxicos.

Uma grande quantidade de pesticidas é usada no controle químico de pestes, e inclui herbicidas, inseticidas e fungicidas. Existe uma enorme variação na composição química desses pesticidas, originando no ambiente diversos compostos como nitrofenóis, triazinas, fenilcarbamatos, organoclorados e organofosforados. A Tabela

1 mostra exemplos da persistência de herbicidas e inseticidas nos solos. Algumas dessas substâncias químicas podem ser usadas pelos microrganismos como fonte de carbono e doadores de elétrons (MADIGAN *et al.*, 1997). Dentre as diversas formas de contaminantes químicos, os organoclorados merecem destaque especial. Os compostos clorados aromáticos e alifáticos são largamente utilizados, não somente na agricultura como pesticidas e herbicidas, mas também na indústria como conservantes de madeira (CHAUDHRY & CHAPALAMADUGU, 1991).

Em função da elevada quantidade e diversidade dos compostos químicos xenobióticos e tóxicos dispostos no ambiente, cujo acúmulo causa diversos problemas, como a poluição dos ecossistemas, é necessário o tratamento destes compostos por processos que visem a minimização do impacto ambiental (FIELD *et al.*, 1995).

TABELA 1 - Persistência de herbicidas e inseticidas nos solos

Substâncias	Tempo para o desaparecimento de 75-100%
Inseticidas clorados	
DDT [1,1,1-tricloro-2,2-bis (p-clorofenil) etano]	4 anos
Aldrin	3 anos
Clordano	5 anos
Heptaclor	2 anos
Lindano (hexaclorociclohexano)	3 anos
Inseticidas organofosforados	
Diazinon	12 semanas
Malation	1 semana
Paration	1 semana
Herbicidas	
2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)	4 semanas
2,4,5-T (ácido triclorofenoxiacético)	20 semanas
Dalapin	8 semanas
Atrazina	40 semanas
Simazina	48 semanas
Propazina	18 meses

Fonte: adaptado de MADIGAN *et al.*, 1997

Assim, os processos anaeróbios de digestão da matéria orgânica podem constituir uma solução tecnológica.

O potencial dos microrganismos termófilos foi inicialmente revelado em estudos sobre a diversidade microbiana. A produção de combustível (gás metano) e ácidos orgânicos foram posteriormente atrativos para o desenvolvimento de sistemas termofílicos de tratamento biológico de rejeitos (VAZOLLER, 1994).

O uso da digestão anaeróbia termofílica (45-65°C) para converter resíduos orgânicos a metano foi um dos primeiros usos biotecnológicos dos termofílicos. Um grande número de estudos usando, tanto reatores em escala de laboratório, como piloto, demonstrou que uma grande variedade de resíduos industriais, domésticos e da agricultura podem ser tratados pela digestão anaeróbia termofílica (ZINDER, 1990).

Por outro lado, o processo de digestão anaeróbia termofílica requer um maior gasto energético quando comparado aos processos mesofílicos de tratamento, devido à necessidade de se manter as altas temperaturas desse sistema. Em alguns casos, tais como indústrias que eliminam seus resíduos as altas temperaturas, este fato não se torna um problema (ZINDER, 1990). Um outro exemplo reside nos digestores termofílicos de larga escala existentes na cidade de Chicago, em que os digestores são auto-suficientes, pois o gás metano produzido é queimado e fornece calor suficiente para a operação do sistema termofílico (RIMKUS *et al.*¹ *apud* ZINDER, 1990).

Estudos de eficiência de sistemas termofílicos comprovam que os compostos fenólicos clorados presentes nos efluentes de indústrias de branqueamento de papel kraft são removidos com uma taxa de degradação de 95%, resultado superior ao obtido em sistemas mesofílicos, onde a remoção de compostos fenólicos clorados tem

¹RIMKUS, R.R.; RYAN, J.M. and COOK, E.J. (1982). Full-scale thermophilic digestion at the West-Southwest Sewage Treatment Works, Chicago, III. *J. Water Pollut. Cont. Fed.* 54, 1447-1457 *apud* ZINDER, S.H. (1990). Conversion of acetic acid to methane by thermophiles. *FEMS Microbiology Reviews*, v.75, p. 125-138.

sido por volta de 40% (HAGGBLOM & SALKINOJA-SALONEN¹ *apud* LEPISTO & RINTALA, 1994).

LARSEN *et al.* (1991) constataram o potencial dos processos anaeróbios termofílicos de tratamento através de estudos com lodos biológicos de diferentes ecossistemas e sua ação na desalogenação termofílica (50°C) do pentaclorofenol (PCP). Através dos resultados obtidos, concluíram que compostos altamente clorados podem ser degradados anaerobiamente, através do processo de desalogenação redutiva, após um período de adaptação. Da mesma forma, BOYD *et al.*², BOYD & SHELTON³, MIKESSELL & BOYD⁴ *apud* LARSEN *et al.* (1991) mostraram que lodos de esgoto, não expostos previamente a clorofenóis, puderam desalogenar redutivamente todos os três monoclorofenóis formados a partir da degradação do composto PCP.

Autores como MINAMI *et al.*⁵, 1991, *apud* LEPISTO & RINTALA 1994, têm demonstrado a eficiência do tratamento anaeróbio termofílico de efluentes da indústria de despolpação, moagem e branqueamento de fibras lignocelulósicas na produção de papel.

Os compostos orgânicos clorados ou organoclorados, são usualmente gerados em fábricas que produzem pasta celulósica usada na síntese de papel, e constituem um sério resíduo passível de ser disposto sem tratamento em Países como o Brasil. A

¹HAGGBLOM, M.; SALKINOJA-SALONEN, M.(1991). Metabolism and kinetics of pentachlorophenol transformation in anaerobic granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.37, p.662-666 *apud* LEPISTO, R.; RINTALA, J. (1994). The removal of chlorinated phenolic compounds from chlorine bleaching effluents using thermophilic anaerobic processes. *Wat. Sci. Tech.*, v.29, n.5, p.373-380. ²BOYD, S.A; SHELTON, D.R.; BERRY, D.; TIEDJE, J.M. (1983). Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.46, p.50-54. ³BOYD, S.A ; SHELTON, D.R. (1984). Anaerobic biodegradation of chlorophenols im fresh and acclimated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.47, p.272-277. ⁴MIKESSELL, M.D. & BOYD, S.A. (1986). Complete reductive dechlorination and mineralization of pentachlorophenol by anaerobic microorganisms. *Applied and Environ. Microbiol.*, v. 52, n.4, p. 861-865 *apud* LARSEN, S; HENDRIKSEN, H.V.; AHRING, B.K. (1991). Potential for Thermophilic (50°C) Anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in different ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.57 (7); p.2085--2090. ⁵MINAMI, K; OKAMURA, S.; NARITOMI, T. (1991). Continuous anaerobic treatment of wastewater from a kraft pulp mill. *J. Ferment. Bioeng.*, v.71, n.4, p.270-274 *apud* LEPISTO, R.; RINTALA, J. (1994). The removal of chlorinated phenolic compounds from chlorine bleaching effluents using thermophilic anaerobic processes. *Wat. Sci. Tech.*, v.29, n.5, p.373-380.

pasta celulósica obtida de materiais lignocelulósicos pelos processos industriais correntes é colorida, devido, principalmente, à presença de lignina e, em menores proporções, de resinas, materiais degradados e íons metálicos. Processos industriais realizam o branqueamento dessa pasta celulósica empregando agentes de cloro, e geram como resíduos compostos orgânicos clorados os quais são lançados no meio ambiente. Com branqueamentos convencionais são produzidos, em média, 5 kg de cloro ligados organicamente por tonelada de pasta celulósica branqueada. Considerando-se uma produção mundial de pasta celulósica branqueada de 50 milhões de toneladas, são lançados no ambiente anualmente cerca de 250 mil toneladas de cloro ligados organicamente (Comitê de efluentes da ABTCP, 1993).

No Brasil, a utilização de compostos orgânicos clorados também constitui outra fonte de contaminação ambiental. O PCP, por exemplo, o qual tem sido listado como um dos prioritários poluentes pela Agência Protetora do Meio Ambiente - EPA dos Estados Unidos, foi utilizado em produtos agrotóxicos e atualmente tem seu uso proibido pela Portaria nº 329 de 02/09/1985 do Ministério da Agricultura, bem como seu transporte, estocagem foram declarados atividades potencialmente poluidoras pelo CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente (Resolução nº 5 de 20/11/1985). Contudo, inúmeras áreas contaminadas pelo PCP ainda persistem (LARIZZATI, 1998). A título de esclarecimento do comprometimento ambiental de áreas contaminadas com PCP no Estado de São Paulo, é apresentado no Apêndice dessa Dissertação o caso RHODIA S/A da cidade de Cubatão.

A presente Dissertação de Mestrado avaliou o comportamento de um lodo anaeróbico termófilo na degradação do pentaclorofenol, através do estudo dos grupos microbianos envolvidos na degradação do composto e no processo de metanogênese.

O lodo anaeróbico estudado foi originado do biodigestor (UASB) de 5000 m³, operado com vinhaça a 55±2°C, da Usina São Martinho, grupo Monte Sereno. Uma importante justificativa desse trabalho foi avaliar a possibilidade da ação microbiana anaeróbia termofílica na transformação do PCP empregando-se lodos biológicos gerados em escala industrial de tratamento de rejeitos, que pudessem servir, no futuro, como inóculos de outros sistemas de tratamento biológico anaeróbico de

efluentes contendo clorofenóis, ou mesmo para outras estratégias adequadas à descontaminação ambiental, como as práticas de remediação biológica de áreas afetadas pelo PCP.

2 - OBJETIVOS

Avaliar o potencial de um lodo proveniente de um reator anaeróbico termofílico (UASB), aplicado ao tratamento de vinhaça, na degradação do composto pentaclorofenol, sob condições de enriquecimento.

Isolar e caracterizar os tipos microbianos anaeróbios termófilos envolvidos na degradação do composto pentaclorofenol, através do método de diluição decimal seriada.

Avaliar a cinética da degradação de um composto organoclorado, através da atividade metanogênica específica (AME).

3 - REVISÃO DA LITERATURA

3.1 - Importância ambiental dos clorofenóis – ênfase ao Pentaclorofenol (PCP)

Os compostos aromáticos clorados representam os principais poluentes ambientais, em virtude de sua larga utilização e enorme quantidade introduzida no meio ambiente. Nessa classe de compostos incluem-se os fenólicos clorados, utilizados na preservação de madeira e também como herbicidas, fungicidas e biocidas, e os compostos benzênicos, utilizados como fumigantes pesticidas e na preservação de tinturas. Os clorofenóis têm sido amplamente utilizados como biocidas de largo espectro (CHAUDHRY & CHAPALAMADUGU, 1991). A produção anual mundial de clorofenóis, na década de 80, foi estimada acima de 200.000 toneladas, sendo aproximadamente 80% empregada na preservação de madeiras (AHLBORG & THUNBERG¹ *apud* HAGGBLOM & VALO, 1995).

Segundo KORTE² *apud* HAGGBLOM & VALO (1995), a produção mundial de PCP em 1984 foi estimada entre 35.000 e 40.000 toneladas. Em 1978, por exemplo, o consumo industrial de pentaclorofenol (PCP) foi de dois a três milhões de kg por ano no Canadá, sendo 80% empregado na preservação de madeiras (WILD *et al.*, 1993).

Há alguns anos, a preocupação quanto ao destino dos clorofenóis no ambiente é crescente, não somente pelas enormes quantidades, mas devido às suas propriedades tóxicas e por serem precursores de outros tóxicos, como por exemplo, as dioxinas. A

¹AHLBORG, U.G.; THUNBERG, T.M. (1980). Chlorinated phenols: occurrence, toxicity, metabolism and environmental impact. *CRC Crit Ver Toxicol* v.7, p.1-35. ² KORTE, F. (1987). *Lehrbuch der ökologischen chemie*. 2nd. Ed. Stuttgart. George Thieme Verlag *apud* HAGGBLOM, M.M.; VALO, R.J. (1995). Bioremediation of chlorophenol wastes. In: CERNIGLIA, C.E. & YOUNG, L.Y., (Eds.) *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*, ed. Wiley-Liss. New York. Cap. 11, p.389-434

incineração de lodos de esgoto municipais contendo clorofenóis, ou produtos de madeira tratados com clorofenóis, podem resultar na formação de dioxinas (BOYD & SHELTON, 1984).

O PCP é considerado como um dos poluentes ambientais prioritários pela Agência de Proteção do Meio Ambiente dos Estados Unidos (USEPA) e pela Comunidade Européia (WILD *et al.*, 1993). A ação desse composto é letal para uma grande variedade de organismos, quer animais ou vegetais, uma vez que previne a incorporação de fosfato ao ATP, sem influenciar no transporte de elétrons. Esse composto parece ser mutagênico ou pelo menos co-mutagênico, sendo a exposição causadora de riscos à saúde (MIKESSEL & BOYD, 1986). É um poluente relativamente resistente à degradação, razão pela qual seu uso cria problemas de poluição quando atinge a natureza (DAMIANOVIC, 1997).

A ampla e intensa aplicação do composto PCP durante vários anos, em diferentes atividades produtivas, faz com que, seja bastante comum ainda encontrá-lo em solos e águas subterrâneas próximos a locais em que a atividade para a preservação de madeiras era usual. Análises de amostras de solo e das águas subterrâneas desses locais revelaram, respectivamente, a existência de milhares de mg de PCP/kg de solo e uma faixa de 0 a 5 mg de PCP/L de água (SABER & CRAWFORD¹ *apud* BANERJI & BAJPAI, 1994). Um estudo sobre a qualidade das águas subterrâneas nos Estados Unidos, realizado com 600 amostras coletadas em 153 regiões de 43 estados americanos, mostrou que 5% das amostras apresentaram níveis detectáveis de PCP (USEPA² *apud* BANERJI & BAJPAI, 1994).

A produção antropogênica de compostos halogenados não representa a única fonte destes compostos para o ambiente. Cloro, bromo, iodo de origem biológica estão largamente distribuídos na Biosfera, particularmente em ambientes marinhos. Existem centenas de compostos organohalogenados obtidos de fontes naturais, incluindo-se os homocíclicos e heterocíclicos. Em função da disponibilidade natural de

¹SABER, D.L.; CRAWFORD, R.L. (1985). Isolation and characterization of *Flavobacterium* strains that degrade pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.50, p.1512-1518. ²USEPA (1981), Wood preservatives: creosote, PCP, and the inorganic arsenicals, Position Document 2/3. Office Pesticide and Toxic Substances *apud* BANERJI, S.K.; BAJPAI, R.K. (1994). Cometabolism of pentachlorophenol by microbial species. *Journal of Hazardous Materials*, v.39, p.19-31.

compostos orgânicos halogenados, não é surpresa a existência de bactérias capazes em degradá-los (SUFLITA & TOWNSEND, 1995). Em 1986, os autores MIKESSEL & BOYD (1986) resumiram a ocorrência da biodegradação do PCP através de passos metabólicos em uma rota complexa, baseada em intermediários clorados que, eventualmente, poderiam ser totalmente desalogenados e mineralizados.

3.2 - Interações metabólicas entre bactérias anaeróbias - Associações sintróficas

O elevado desempenho dos biodigestores anaeróbios modernos é consequência da organização eficiente dos microrganismos anaeróbios, pela formação de nichos ecológicos como os lodos granulados e biofilmes (CRAVEIRO, 1994; FORESTI, 1994). Diferentes microrganismos sinergicamente relacionados, estão envolvidos no processo de tratamento anaeróbio de rejeitos. Dessa maneira, mudanças no ambiente do reator e distúrbios no balanço da população microbiana freqüentemente resultam em deficiência do tratamento (YAMAGUCHI *et al.*, 1991).

Os lodos granulados anaeróbios são consórcios microbianos auto-imobilizados os quais formam uma estrutura matricial com um diâmetro variando de 0,1 a 5,0 mm. Esta estrutura granular ajuda a proteger as bactérias anaeróbias das condições desfavoráveis do meio ambiente tais como mudanças no pH e exposição ao oxigênio, também fornece condições favoráveis para o metabolismo sintrófico de substratos e para o co-crescimento de diferentes espécies microbianas. Os organismos prevaescentes nos grânulos são geralmente metanogênicos, acetogênicos sintróficos e bactérias hidrolíticas fermentativas (WU *et al.*, 1992).

A degradação anaeróbia da matéria orgânica complexa em sistemas naturais ou em biodigestores pode ser explicada através de esquemas. A Figura 1, segundo MADIGAN *et al.* (1997), ilustra um ambiente metanogênico, onde a matéria orgânica é degradada por associações de bactérias fermentativas, acetogênicas e metanogênicas. Bactérias consumidoras de hidrogênio e formiato e algumas consumidoras de acetato através da metanogênese, têm influência sobre o metabolismo de outra bactéria. Produtos formados pelas bactérias fermentativas são alterados a produtos mais oxidados por outros grupos bacterianos que fazem parte

desse consórcio. As bactérias acetogênicas são capazes apenas de metabolizarem compostos quando as metanogênicas consomem hidrogênio e formiato eficientemente. Hidrogênio deve ser continuamente removido do meio para assegurar que a produção de ácido acético não seja interrompida ou diminua drasticamente. Essa condição é essencial para que a fermentação metanogênica prevaleça, pois a metanogênese só ocorre quando há a produção de alguns substratos específicos, sendo o H_2 e ácido acético os mais importantes, responsáveis por cerca de 30% e 70%, respectivamente do gás metano gerado em biodigestores. Esses tipos de interações metabólicas entre bactérias anaeróbias devem existir em relação ao fato de que a oxidação do NADH e $FADH_2$, os quais vão reduzir o próton ou o bicarbonato, somente ocorrerá quando as concentrações de hidrogênio e formiato forem baixas. As metanogênicas catabolizam H_2 , formiato e acetato eficientemente. Relações sintróficas que dependem de transferência de hidrogênio e formiato interespecies foram descritas para a degradação de, por exemplo, ácidos orgânicos voláteis, aminoácidos e compostos aromáticos (STAMS, 1994; FORESTI, 1994).

Para os organismos aeróbios, essas relações sintróficas são menos importantes do que para aqueles presentes nas cadeias alimentares anaeróbias. Organismos aeróbios podem degradar completa e rapidamente moléculas a CO_2 e H_2O , sem relações obrigatórias com outros organismos. Isto pode estar relacionado com o fato de que o catabolismo energético de materiais complexos com o O_2 como acceptor de elétrons, ser muito mais favorável do que o catabolismo fermentativo de alguns substratos. Entretanto, quando as condições tornam-se anóxicas e os aceptores de elétrons escassos, o catabolismo fermentativo predomina, mas em muitos casos requer interações sintróficas (MADIGAN *et al.*, 1997).

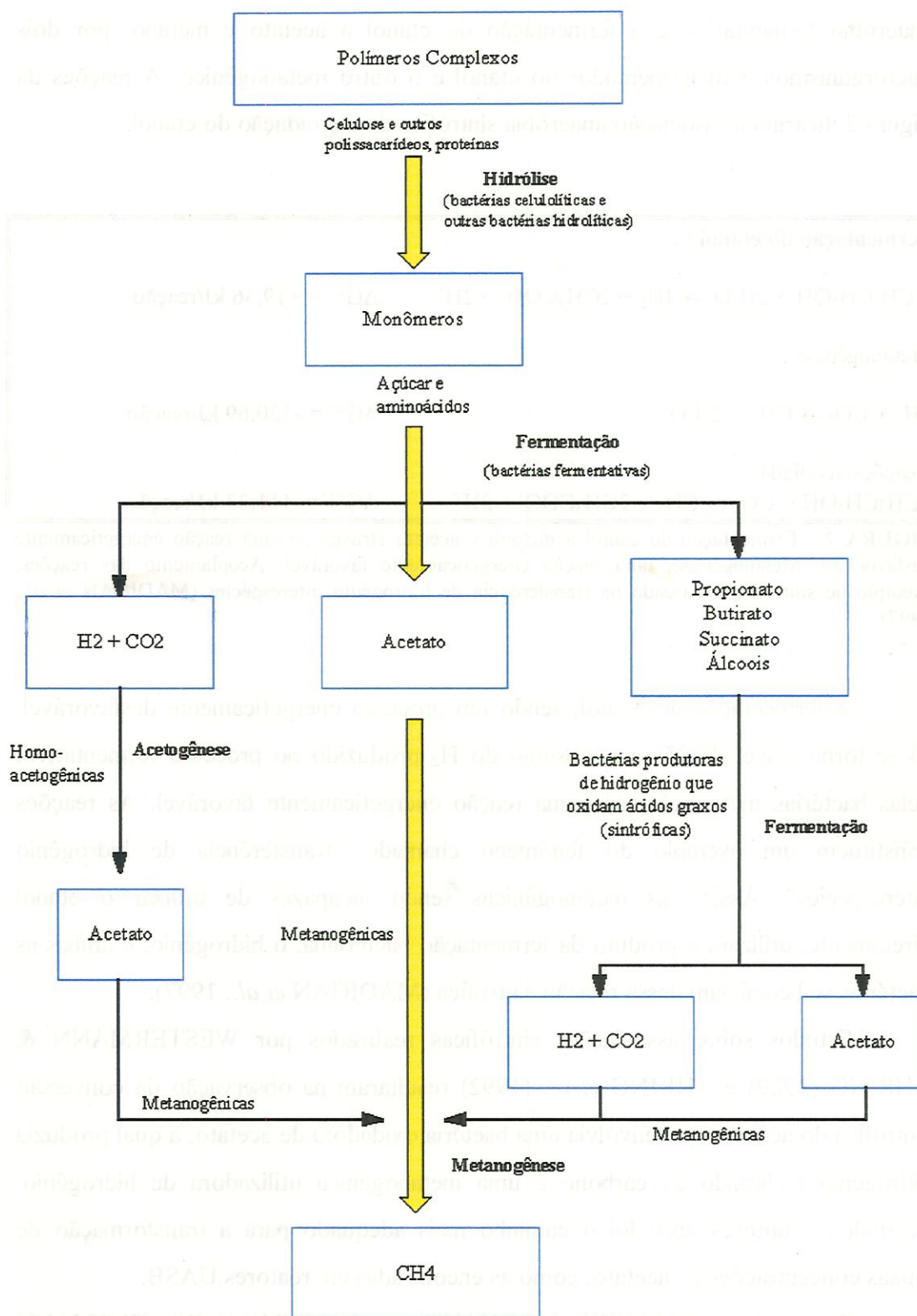


FIGURA 1: Relações metabólicas no processos de decomposição anaeróbica. Grupos bacterianos anaeróbios atuando juntos na conversão da matéria orgânica complexa a metano e dióxido de carbono (adaptado de MADIGAN *et al.*, 1997).

Um dos melhores exemplos de associações sintróficas durante o metabolismo anaeróbio fermentativo é a fermentação do etanol a acetato e metano, por dois microrganismos. Um fermentador do etanol e o outro metanogênico. As reações da Figura 2 ilustram a associação anaeróbia sintrófica da degradação do etanol.

Fermentação do etanol :



Metanogênese :



Reações acopladas :



FIGURA 2 - Fermentação do etanol a metano e acetato através de uma reação energeticamente desfavorável. Metanogênese, uma reação energeticamente favorável. Acoplamento das reações, exemplo de sintrofismo baseado na transferência de hidrogênio interespecies (MADIGAN *et al.*, 1997).

A fermentação do etanol, sendo um processo energeticamente desfavorável, só se torna viável devido ao consumo do H_2 produzido no processo fermentativo, pelas bactérias metanogênicas numa reação energeticamente favorável. As reações constituem um exemplo do fenômeno chamado “transferência de hidrogênio interespecies”. Assim, as metanogênicas sendo incapazes de utilizar o etanol diretamente, utilizam o produto da fermentação bacteriana, o hidrogênio, e ambas as bactérias se beneficiam dessa relação sintrófica (MADIGAN *et al.*, 1997).

Estudos sobre associações sintróficas realizados por WESTERMANN & AHRING (1989) e AHRING *et al.* (1992) resultaram na observação da conversão sintrófica do acetato, que envolvia uma bactéria oxidadora de acetato, a qual produzia hidrogênio e dióxido de carbono e uma metanogênica utilizadora de hidrogênio. Segundo os autores, este foi o caminho mais adequado para a transformação de baixas concentrações de acetato, como as encontradas em reatores UASB.

De acordo com MACKIE & BRYANT¹ *apud* AHRING & WESTERMANN (1987), ácidos orgânicos voláteis (AOV), como o propionato e butirato são responsáveis por 20% do gás metano produzido em um biodigestor anaeróbio. Assim

sendo, muitas bactérias acetogênicas mesofílicas utilizadoras de ácidos orgânicos voláteis em co-cultura com espécies metanogênicas ou bactérias redutoras de sulfato hidrogenotróficas têm sido descritas, por exemplo, a linhagem *Syntrophomonas wolfei*, que oxida ácidos orgânicos voláteis a acetato e hidrogênio ou acetato, propionato e hidrogênio (McINERNEY *et al.*², McINERNEY *et al.*³ *apud* AHRING & WESTERMANN (1987), e a *Syntrophobacter wolinii*, que degrada propionato a acetato, hidrogênio e dióxido de carbono (BOONE & BRYANT⁴ *apud* AHRING & WESTERMANN, 1987).

DOLFING & TIEDJE (1986) também evidenciaram em seus estudos a importância do uso de culturas mistas. Analisaram que uma cultura mista consistindo da linhagem *Desulfomonile tideje*, BZ-1 (uma bactéria degradadora de benzoato) e uma bactéria metanogênica utilizadora de hidrogênio, a *Methanospirillum hungatei*, foi capaz de degradar 3-clorobenzoato a metano e dióxido de carbono.

Relacionando o grande potencial das relações sintróficas na degradação de compostos aromáticos, as bactérias anaeróbias possuem a capacidade de realizar o processo de desalogenação redutiva de compostos tóxicos orgânicos clorados, incluindo bifênilos policlorados (PCBs), tetracloroetileno (PCE) e benzenos clorados. Esses compostos são recalcitrantes para o metabolismo aeróbio, mas podem ser desalogenados redutivamente sob anaerobiose, a compostos menos clorados, e assim, posteriormente, mineralizados a CO₂ por organismos aeróbios. Alguns compostos aromáticos, tais como clorofenóis e clorobenzoatos podem ser mineralizados a CH₄ e CO₂ sob condições anaeróbias. Pesquisas revelaram a capacidade da linhagem bacteriana *Desulfomonile tiedje*-DCB-1, na desalogenação do PCP, com a retirada de cloros na posição *meta*, entretanto, microrganismos em cultura pura capazes de

¹MACKIE, R.I.; BRYANT, M.P. (1981). Metabolic activity of fatty acid-oxidizing bacteria and the contribution of acetate, propionate, butyrate, and CO₂ to methanogenesis in cattle waste at 40 and 60°C. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.41, p.1363-1373. ²McINERNEY, M.J.; BRYANT, M.P.; HESPELL, R.B.; COSTERTON, J.W. (1979). *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., na anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.41, p. 1029-1039. ³McINERNEY, M.J.; BRYANT, M.P.; PFENNIG, N. (1979). Anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens. *Arch. Microbiol.*, v.122, p. 129-135. ⁴BOONE, D.R.; BRYANT, M.P. (1980). Propionate-degrading bacterium. *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. Nov., from methanogenic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.40, p.626-632 *apud* AHRING, B.K.; WESTERMAN, P. (1987). Thermophilic anaerobic degradation of butyrate by a butyrate-utilizing bacterium in coculture and triculture with methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 53, n. 2, p.429-433.

realizar a completa desalogenação redutiva do PCP são mais difíceis de serem encontrados (WU *et al.*, 1992).

A desalogenação redutiva é um importante meio de biodegradação de numerosos compostos, incluindo pesticidas organoclorados, e é conhecida por ocorrer apenas nas comunidades microbianas anaeróbias. Usando culturas indefinidas, pesquisas estão começando a revelar a ecologia dessas comunidades, as quais ocorrem em solos, sedimentos, tratos intestinais e biorreatores (MOHN & TIEDJE, 1992). O processo de desalogenação redutiva, detalhes e exemplos, estão citados em capítulo específico a este assunto.

As relações sintróficas mostraram-se presentes nos estudos em biodigestores anaeróbios termofílicos que tratam vinhaça de uma usina de açúcar e álcool. As características morfológicas do lodo anaeróbio termofílico, originado do biodigestor, foram avaliadas quando o lodo foi enriquecido com os mais diferentes substratos. Enriquecimentos iniciais das culturas em apenas acetato de sódio apresentaram turvação elevada e grumos de bactérias em suspensão, além da boa produção de metano. Análises microscópicas dos grumos bacterianos nas diluições 10^{-3} a 10^{-6} , revelaram células fluorescentes em formato de sarcina. Sub-cultivos dessas amostras foram feitos em meio BCYT contendo 30 mM de acetato de sódio. Após 15 dias de incubação, os sub-cultivos revelaram o predomínio de bacilos pequenos com fluorescência, e em menor quantidade, sarcinas fluorescentes e bacilos longos não fluorescentes. O sub-cultivo dessas culturas em duplicata no meio Zinder contendo acetato de sódio, após 15 dias de incubação, também revelou a presença dos mesmos morfotipos celulares. A análise das células, sob coloração de Gram, mostrou a maioria dos bacilos com coloração Gram negativa (VAZOLLER, 1995).

ZINDER & KOCH (1984) através da operação de um biodigestor à 55°C, com resíduo sólido predominantemente constituído por material ligno-celulósico, identificaram uma co-cultura capaz de converter o acetato a metano, sendo a espécie metanogênica a *Methanobacterium* THF. A co-cultura, segundo os autores, pareceu operar de acordo com um mecanismo proposto por BARKER & van NIEL, em que o acetato seria primeiramente oxidado em hidrogênio e dióxido de carbono, e em segundo passo incluiria a redução do dióxido de carbono a metano. A microscopia de

contraste de fase e epifluorescência revelaram que a co-cultura era formada por um bacilo ligeiramente curvo com 1 μm em espessura e de 3 a 8 μm em comprimento, não fluorescente, e o outro ligeiramente curvo, mais fino (0,75 μm), podendo formar filamentos de até 20 μm , com fluorescência azul-esverdeada (*Methanobacterium* THF). Nenhum crescimento foi observado em meio contendo, separadamente, extrato de levedura, glicose, piruvato, lactato e em meio de Brewer contendo tiosulfato.

ZINDER & KOCH (1984) estimaram a quantidade de energia envolvida nas reações realizadas pela co-cultura através do cálculo da variação de energia livre padrão a 25°C, como mostrado na Tabela 2. Segundo os autores, os valores para a pressão parcial de hidrogênio de 4×10^{-5} atm seriam os mais adequados para sustentar a reação. A importância do mecanismo de oxidação do acetato para os habitats anaeróbios não é clara; é possível que, para biodigestores com elevadas cargas orgânicas, a pressão parcial de hidrogênio seja tão alta que permita as oxidadoras de acetato a competirem com as metanogênicas acetoclásticas. Ainda, a variação de energia livre padrão da quebra e metanogênese direta do acetato é de -31,0 KJ/reação, semelhante a soma da energia livre padrão da co-cultura.

TABELA 2 - Reações postuladas para a metanogênese bacteriana termófila do acetato através da ação da co-cultura isolada por ZINDER & KOCH (1984), e as variações de energia livre padrão (25°C).

Mecanismo: Oxidação do acetato		ΔG° (KJ/reação)
Cultura I: $\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	$\Leftrightarrow 2\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+$	+104,6
Cultura II: $4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	$\Rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-135,6
Soma: $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O}$	$\Rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31

Fonte: ZINDER & KOCH (1984)

Experimentos em laboratório realizados por AHRING (1991), procuraram avaliar a atividade microbiana durante a metanogênese do acetato sob temperaturas termofílicas e termofílicas extremas. Exames microbiológicos das amostras de plantas termofílicas industriais produtoras de biogás, operadas à temperaturas de 50 a 56°C, empregando métodos clássicos e anticorpos fluorescentes marcados para investigar a

presença de metanogênicas acetotróficas, mostraram que o gênero *Methanosarcina* foi o único gênero de metanogênica acetotrófica presente nas amostras. Este resultado está de acordo com as altas cargas orgânicas aplicadas nesses sistemas de reatores que, geralmente, resultam em altas concentrações de acetato no efluente do reator, promovendo o crescimento em massa de metanogênicas pertencentes ao gênero *Methanosarcina* (MIN & ZINDER¹, 1989; WESTERMANN *et al.*², 1989 *apud* AHRING, 1994).

Culturas enriquecidas crescendo em acetato sob condições termofílicas à 70°C, obtidas de reatores UASB e de reatores tratando esgoto doméstico, não apresentaram gêneros conhecidos de metanogênicas acetotróficas. As culturas foram predominantemente constituídas por bactérias na forma de bacilos espessos oxidadores de acetato, e bacilos pequenos que fluoesciam, característica comum às metanogênicas utilizadoras de hidrogênio. Esses últimos mostraram reação positiva quando submetidos a testes com anticorpos utilizados na identificação de espécies de *Methanobacterium* sp (AHRING, 1994).

VAZOLLER (1995), em seu trabalho de estudo do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbico termofílico (UASB) operando com vinhaça, avaliou o lodo desse biodigestor através de diversos tipos de enriquecimento e com os lodos coletados em três diferentes períodos designando-os em lodos I (final da safra da vinhaça), II (repartida; início da safra) e III (regime estacionário). Houve o isolamento de culturas bacterianas acetoclásticas produtoras de metano a partir do enriquecimento do lodo I com acetato de sódio. Sub-cultivos foram feitos e o crescimento nas maiores diluições (10^{-4} e 10^{-5}) mostrou apenas dois tipos de bacilos denominado de cultura 1, que em cultivo em meio Zinder com acetato de sódio produzia metano. Verificou-se, após séries de diluições que se tratava de uma cocultura de bacilos constituída por bacilos pequenos e fluorescentes livres e bacilos não fluorescentes, com dimensões maiores que os anteriores, livres ou formando

¹MIN, H.; ZINDER, S.H. (1989). Kinetics of acetate utilization by two thermophilic acetotrophic methanogens: *Methanosarcina* sp. strain CALS-1 *Methanotrix* sp. strain CALS-1. Appl. Environ. Microbiol., v.52, p.617-622. ²WESTERMANN, P.; AHRING, B.K.; MAH, R.A. (1989). Threshold acetate concentrations for acetate catabolism by acetoclastic methanogenic bacteria. Applied Environmental Microbiology, v.55, p. 514-515 *apud* AHRING, B.K. (1994). Status on science and application of thermophilic anaerobic digestion. Wat. Sci. Tech., v.30, n.12, p.241-249.

cadeias. Uma cultura 2 foi obtida a partir de uma amostra do lodo III sub-cultivada em 4 séries consecutivas de diluições decimais. A diluição 10^{-3} do primeiro sub-cultivo apresentou a formação de grumos bacterianos, fluorescentes sob microscopia revelando o formato de sarcinas.

A co-cultura (cultura 1) e a cultura metanogênica em formato de sarcinas (cultura 2) foram avaliadas quanto a capacidade de utilização de outros substratos precursores de metano, além do acetato. A Tabela 3 mostra a resposta do crescimento celular da cultura 1 frente aos substratos testados. A Tabela 4, mostra o crescimento pela formação de grumos suspensos (cultura 2), no meio de cultivo acrescido individualmente dos substratos acetato, metanol, formiato e mistura gasosa de hidrogênio e dióxido de carbono.

TABELA 3 - Leitura dos testes para verificação do crescimento da cultura 1 em diferentes substratos orgânicos

SUBSTRATOS ORGÂNICOS	TEMPO DE INCUBAÇÃO (dias)		
	2	5	15
acetato de sódio	+	+	/
H ₂ CO ₂	-	+	++
metanol	+	++	/
formiato de sódio	-	+	++
etanol	-	+	++
etilenoglicol	+	++	/

- ausência de crescimento; + crescimento positivo; ++ crescimento intenso; / término da incubação.

Fonte: modificado de VAZOLLER, 1995

TABELA 4 - Leitura dos testes para a verificação do crescimento da cultura 2 em diferentes substratos orgânicos

SUBSTRATOS ORGÂNICOS	TEMPO DE INCUBAÇÃO (dias)			
	2	5	10	15
acetato de sódio	+	+	/	/
H ₂ CO ₂	-	-	-	-
metanol	-	+	++	/
formiato de sódio	-	-	-	-

- ausência de crescimento; + crescimento positivo; ++ crescimento intenso; / término da incubação. Fonte: modificado de VAZOLLER, 1995

A Tabela 5 revela a resposta do comportamento da cultura metanogênica em formato de sarcina (cultura 2), em relação ao crescimento das células, em 4 diferentes temperaturas: 37,45,57 e 67°C, tendo como substratos acetato de sódio e metanol.

TABELA 5 - Leitura dos testes para verificação do crescimento da cultura metanogênica em formato de sarcinas em diferentes temperaturas.

TEMPERATURAS TESTADAS (°C)	TEMPO DE INCUBAÇÃO (dias)			
	2	5	15	30
37	+	+	/	/
45	-	+	/	/
57	+	+	/	/
67	-	-	-	-

- ausência de crescimento; + crescimento positivo; ++ crescimento intenso; / término da incubação. Fonte: adaptado de VAZOLLER, 1995

O estudo acima citado (VAZOLLER, 1995) produziu resultados importantes no que se refere à ecologia microbiana de um reator termofílico (UASB), tratando vinhaça e inoculado com lodo de esgoto e esterco de gado. O autor obteve culturas enriquecidas do lodo granular usando substratos orgânicos selecionados que ocorrem durante a digestão anaeróbia da vinhaça. Duas culturas metanogênicas acetoclásticas foram isoladas e identificadas: uma co-cultura de *Methanobacterium* sp e *Desulfotomaculum* sp e a segunda a *Methanosarcina* sp. O isolamento de uma co-cultura metanogênica acetoclástica indica que o acetato no reator foi convertido a metano, através dos intermediários hidrogênio e dióxido de carbono.

van LIER *et al.* (1996) também avaliaram a conversão de ácidos orgânicos como o propionato, butirato e acetato por lodos granulados termófilos em dois sistemas descontínuos mantidos a 55°C. Os resultados sugeriram que populações degradadoras de propionato, em lodos granulados termófilos, podem ser pouco numerosas, pois maiores tempos para a degradação de propionato foram necessárias, se comparados com os tempos de degradação do acetato e butirato.

3.3 - O co-metabolismo e a degradação do pentaclorofenol

Estudos relacionados com a degradação microbiana foram realizados por LEDBETTER & FOSTER que definiram, em 1959, o termo co-oxidação para descrever o processo em que um microrganismo oxida um composto sem usar a energia derivada de sua oxidação. Com avanço nos estudos, um termo mais geral, cometabolismo, foi definido para incluir outros processos tais como a reação de desalogenação conduzida por alguns microrganismos (LEDBETTER & FOSTER¹ *apud* BANERJI & BAJPAI, 1994).

O processo do cometabolismo tem sido observado tão freqüentemente, que representa um processo microbiano potencialmente importante. Em numerosos casos, os microrganismos possuem um potencial metabólico de versatilidade impressionante para a quebra de uma grande variedade de compostos orgânicos químicos sintéticos. Uma porção significativa da atividade biodegradativa de compostos antropogênicos pode envolver o cometabolismo, um processo no qual os microrganismos, enquanto crescem às custas de um substrato, têm a capacidade de transformar outros compostos sem que haja algum benefício direto ao metabolismo (VENKATARAMANI & AHLERTT, 1985).

Uma outra forma para a compreensão do processo de cometabolismo é definida pelos autores BANERJI & BAJPAI (1994); HOLLIGER & SCHUMACHER (1994). Segundo os autores, os microrganismos possuem vários tipos de metabolismo

¹LEDBETTER, E.G.; FOSTER, J.W. (1959). Oxidation products formed from gaseous alkanes by the bacteria *Pseudomonas methanica*. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.82, p.491-492 *apud* BANERJI, S.K.; BAJPAI, R.K. (1994). Cometabolism of pentachlorophenol by microbial species. *Journal of Hazardous Materials*, v.39, p.19-31.

que os levam à obtenção de energia para o crescimento e que essa energia é proveniente da degradação de um composto orgânico. A degradação fortuita de um composto energético e/ou de um outro composto que não trará benefícios energéticos ou de síntese celular, ocorre através da ação de enzimas sintetizadas pela própria célula microbiana. Dessa maneira, quando um microrganismo realiza esse metabolismo fortuito, isto é, sem vantagens conhecidas, dá-se o nome de cometabolismo. No processo de cometabolismo, o composto degradado é considerado um substrato secundário, isto é, a degradação de tal composto pelos microrganismos não implica na obtenção de energia, e os metabólitos ou os produtos formados dessa degradação podem ser usados por outros microrganismos como fonte energética.

Segundo JANSSEN & KONING (1995), culturas puras capazes de crescer na presença de alifáticos clorados têm sido isoladas em amostras de sistemas de tratamento de águas residuárias por lodos ativados, de solos ou sedimentos que tiveram contato com esses compostos. Para um grande número de compostos, apenas a degradação cometabólica tem sido mostrada. Por definição, isto significa que a conversão não é útil para o microrganismo. Exemplos de degradação de certos compostos estudados pelos autores foram o clorofórmio, o tricloroetileno e o 1,1,1-tricloroetano, os quais foram convertidos através de oxigenases específicas microbianas, sem haver envolvimento energético e conseqüente crescimento celular. Os estudos mostraram que dentre os compostos estudados, o processo de desalogenação redutiva só fornece energia para o crescimento no caso da degradação do tetracloroetano, ao passo que a desalogenação redutiva de vários outros compostos clorados, que envolve o cometabolismo, ocorre sem que haja benefício relacionados com o crescimento microbiano.

De acordo com definições citadas na introdução dessa revisão, a respeito de compostos recalcitrantes, tem-se que um composto é considerado recalcitrante se não for transformado pelo processo de tratamento em horas ou em dias dependendo do tipo de tratamento biológico empregado. Independentemente do tipo de tratamento ou do tempo levado na degradação de tais compostos, o cometabolismo pode ser um caminho usado pelos microrganismos na degradação dos compostos recalcitrantes

como o DDT; 2,4,5-T e 2,3,6-TBA (HORVATH, 1972). Dessa maneira, conclui-se que o processo de cometabolismo é um importante processo natural, pelo qual muitos compostos orgânicos tóxicos e de difícil degradação são biodegradados e tornados menos tóxicos (BANERJI & BAJPAI, 1994).

De acordo com citações de HOLLIGER & SCHUMACHER (1994), compostos perigosos podem ser biorremediados através do cometabolismo. Um composto pode ser degradado parcialmente ou totalmente, e a sua toxicidade pode ser eliminada ou não. A eliminação da toxicidade não implica na total mineralização do composto, isto é, eliminação da toxicidade com redução total a compostos menores como dióxido de carbono.

3.4 - Microbiologia da degradação do pentaclorofenol

Considerando o enorme período de existência dos microrganismos na Biosfera, aproximadamente quatro bilhões de anos, observa-se que uma grande variedade de enzimas, vias bioquímicas e mecanismos de regulação microbiana foi desenvolvida, capacitando os microrganismos a utilizar, por exemplo, diversos compostos aromáticos de origem natural (REINEKE & KNACKMUSS, 1988). A biodegradação, portanto, é menos provável no caso de moléculas que possuam estruturas não semelhantes àquelas encontradas na natureza, isto é, compostos químicos artificialmente sintetizados e disseminados na Biosfera (VENKATARAMANI & AHLERTT, 1985).

Os compostos aromáticos halogenados podem ser degradados biologicamente sob condições aeróbias ou anaeróbias. Assim, a capacidade degradativa aeróbia ou anaeróbia é selecionada dependendo da presença ou da ausência do oxigênio molecular (LARIZZATTI, 1997). Alguns compostos aromáticos policlorados parecem sofrer, preferencialmente, a degradação microbiana através do cometabolismo e não servem como substrato para o crescimento celular. De acordo com a literatura, é pequeno o número de microrganismos aeróbios e anaeróbios capaz de usar compostos aromáticos halogenados (REINEKE & KNACKMUSS, 1988).

De Acei

A capacidade em biodegradar um determinado composto pode ser estimulada, cuidadosamente, pela combinação correta de doadores e aceptores de elétrons, e no caso de cometabolismo, da escolha do substrato primário, isto é, um substrato que seja degradado para a produção de energia (FIELD *et al.*, 1995). Vários estudos realizados demonstraram que a degradação de compostos tóxicos aromáticos pode ocorrer em sistemas biológicos nos quais o metabolismo microbiano esteja relacionado a processos de desnitrificação, redução do íon sulfato, fermentação, metanogênese e fotossíntese anaeróbia, além de condições dominantes de oxigênio (DAMIANOVIC, 1997). Compostos halogenados como os clorofenóis são, em geral, muito tóxicos. Esta característica pode inviabilizar a ação dos microrganismos em relação à quebra desses compostos halogenados. Com isso, acumulam-se no meio ambiente em lençóis de água, aquíferos naturais e sedimentos marinhos, pois a disseminação desses compostos no ambiente é contínua, através de águas residuárias domésticas e industriais (LARSEN *et al.*, 1991).

WEGMAN & van den Broek¹ *apud* McALLISTER *et al.* (1996) investigaram a presença de clorofenóis em sedimentos de rios na Holanda. Amostras de trinta e cinco locais foram examinadas e revelaram a contaminação, especialmente por clorofenóis, em que o PCP esteve presente. Nas amostras de sedimentos contendo baixas concentrações de clorofenóis, o PCP foi detectado entre 0,2-4,6 g/kg de sedimento em peso seco. Essa incidência de contaminação por clorofenóis salienta a necessidade de se encontrarem métodos para a remoção do mesmo do ambiente.

BANERJI & BAJPAI (1994) descreveram o cometabolismo do PCP na presença de dextrose, com uma cultura pura (*Pseudomonas cepacia*) e uma cultura mista adaptada em duas concentrações de PCP (60 e 100 mg/L), a partir de uma planta de lodo ativado. A linhagem *Ps. cepacia* degradou PCP na concentração de 50 mg/L, sem que houvesse uma fase de adaptação significativa. Com um aumento na concentração de PCP, para 100 mg/L, houve uma significativa fase de adaptação pelas células e a degradação do PCP não foi iniciada até que o crescimento celular

¹WEGMAN, R.C.C.; van den BROEK, H.H. (1983). Chlorophenols in river sediment in the Netherlands. *Water Res.*, v.17, p.227-230 *apud* McALLISTER, K.A.; LEE, H.; TREVORS, J.T. (1996). Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation*, v.7, p.1-40.

ocorresse. A degradação do PCP foi de 80%, e neste caso, a cultura de *Ps. cepacia* utilizou dextrose como fonte de carbono e energia, enquanto que o PCP foi usado como cometábolo.

O mesmo artigo, de BANERJI & BAJPAI (1994), relatou que a cultura mista cometabolizou o PCP na presença de dextrose na concentração de 1000 mg/L. Essa cultura, previamente adaptada a concentrações de 60 e 100 mg/L de PCP em uma planta de lodo ativado, degradou PCP mais rapidamente que a linhagem *Ps. cepacia*. As células da cultura mista poderiam ser progressivamente adaptadas com 100 mg/L de PCP, usando-o como única fonte de carbono e energia, com uma taxa de degradação igual àquelas, quando a dextrose esteve presente como substrato primário. A concentração de dextrose foi, então, reduzida progressivamente de 1000 mg/L para 0 mg/L, enquanto que a concentração de PCP foi mantida em 100 mg/L. Na presença de 1000 mg/L de dextrose, aproximadamente 40% de PCP foi degradado num período aproximado de 52 horas. Quando a concentração de dextrose foi reduzida para 500 mg/L, a taxa de remoção do PCP foi maior do que 95% num período de aproximadamente 24 horas. Baseado nesses resultados, é possível que concentrações de dextrose maiores do que 500 mg/L dificultam a remoção do PCP por essas células. Segundo estudos realizados por LIU *et al.*¹ *apud* BANERJI & BAJPAI, 1994, concentrações de glicose na faixa de 500 mg/L inibiram a taxa de degradação de PCP por culturas mistas.

A degradação microbiana é uma importante alternativa biológica para a remoção do PCP do meio ambiente, podendo ser destacado, principalmente, três processos através dos quais o PCP pode ser biodegradado: oxigenólise, desalogenação redutiva e hidroxilação, os quais são exemplificados na Figura 3. Esses processos de remoção do PCP, ocorrem naturalmente, dependendo do tipo de meio contaminado, aeróbio ou anaeróbio. Em ambientes aeróbios, o oxigênio molecular está envolvido de duas maneiras. Primeiramente, o oxigênio é incorporado no anel

¹LIU, D.; THOMPSON, K.; STRACHAN, W.M.J. (1981). Biodegradation of pentachlorophenol in simulated aquatic environment. Bull. *Environ. Contam. Toxicol.*, v.26, p.85-90 *apud* BANERJI, S.K. & BAJPAI, R.K. (1994). Cometabolism of pentachlorophenol by microbial species. *Journal of Hazardous Materials*, v.39, p.19-31.

aromático pelas mono ou dioxigenases, causando a fissão do anel, processo conhecido como oxigenólise e, posteriormente, pode servir como acceptor final de elétrons, reduzindo os equivalentes gerados durante a oxidação da molécula aromática. No processo de desalogenação reductiva, o composto orgânico halogenado desempenha papel de acceptor de elétrons e um halogênio é permutado por um átomo de hidrogênio, com transferência de dois elétrons. Esse processo ocorre pela ação das desalogenases. No processo de hidroxilação, o que ocorre é uma substituição, na qual um átomo substituí outro na molécula. No caso da substituição hidrolítica em moléculas orgânicas, a reação consiste na substituição do íon haleto por uma hidroxila. A remoção do PCP também pode ocorrer por processos abióticos, tais como volatização, fotodecomposição e absorção, como por exemplo, a absorção de PCP na matéria orgânica presente em sedimentos aquáticos (McALLISTER *et al.*, 1996; BHATNAGAR & FATHEPURE, 1991; LARIZZATI, 1997).

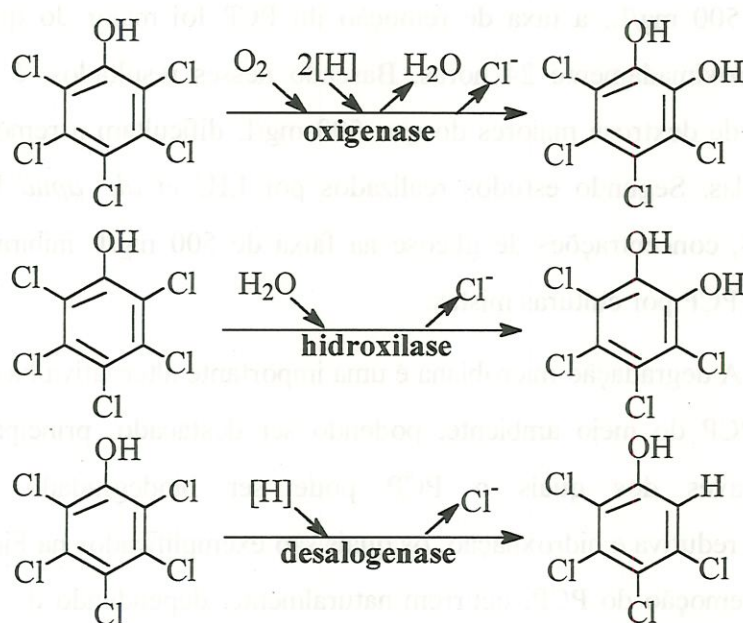


FIGURA 3 - Caminhos de degradação do PCP usados pelo metabolismo microbiano

Fonte: adaptado de McALLISTER *et al.*, 1996

A desalogenação reductiva é principalmente conhecida por ocorrer em anaerobiose, sendo o passo inicial na biodegradação anaeróbia da maioria dos haletos

de arila, mas o processo pode, também, estar envolvido na degradação aeróbia de certos compostos altamente halogenados (WU *et al.*, 1992).

A desalogenação aeróbia de compostos orgânicos clorados pode ocorrer, provavelmente, por diferentes mecanismos bioquímicos, em relação a biodegradação anaeróbia. A desalogenação redutiva é de particular interesse ambiental, devido à rapidez com que as condições anóxicas podem se estabelecer em habitats poluídos (MADIGAN *et al.*, 1997).

A degradação aeróbia do PCP por culturas microbianas mistas é um processo importante, e em geral, ocorre em locais contaminados como superfícies de solo ou sedimentos que suportem o crescimento e a atividade de consórcios microbianos pela presença do oxigênio. A degradação do PCP pode ocorrer por esforços combinados entre diferentes espécies de microrganismos aeróbios. Para que ocorra a degradação aeróbia do PCP, a barreira inicial que deve ser transposta pelo consórcio microbiano é a toxicidade do PCP, isto é, a atividade microbiana pode ser influenciada por certas concentrações de PCP, as quais passam a ter um efeito inibitório. Algumas culturas puras de bactérias aeróbias, isoladas de locais contaminados, são capazes de mineralizar uma alta concentração de PCP (200 mg/L) (McALLISTER *et al.*, 1996).

Uma bactéria aeróbia com habilidade em degradar clorofenóis é a *Flavobacterium* sp.. Essa habilidade em desalogenar e mineralizar vários clorofenóis foi relatada nos exemplos de substituição do anel clorado de compostos específicos. Esse trabalho com *Flavobacterium* sp. também relatou que as enzimas bacterianas usadas na degradação do PCP são controladas por um sistema enzimático induzido e que a adição de PCP, 2,4,6-triclorofenol e 2,3,5,6-tetraclorofenol são indutores para a completa degradação do PCP. Células de *Flavobacterium* sp. induzidas para a degradação do PCP, foram capazes de desalogenar e mineralizar os compostos 2,3,4,6 e 2,3,5,6-tetraclorofenóis, 2,3,6 e 2,4,6-triclorofenóis e 2,6-diclorofenóis. Por outro lado, células não induzidas na degradação do PCP, foram capazes de desalogenar e mineralizar PCP, 2,3,5,6-tetraclorofenol e 2,4,6-triclorofenol mas apenas depois de uma fase de adaptação. Medidas de oxigênio mostraram que houve consumo do gás, estimulando a degradação de todos os fenóis clorados testados com células de *Flavobacterium* sp. que tinham sido induzidas para a degradação do PCP.

Nesse estudo, foi verificado que, dentre os fenóis clorados estudados, aqueles que foram degradados com consumo de oxigênio, e significativa mineralização, foram PCP, 2,3,5,6-tetraclorofenol e 2,4,6-triclorofenol (STEIERT *et al.*, 1987).

Sob condições anaeróbias, o oxigênio molecular não está envolvido na quebra dos compostos aromáticos. Como consequência, alguns tipos de compostos aromáticos são difíceis de serem degradados, em particular, compostos aromáticos sem grupos funcionais (benzeno, tolueno, naftaleno, etc.). Entretanto, compostos aromáticos altamente clorados (ex. hexaclorobenzeno) podem ser eficientemente degradados sob condições anaeróbias (FIELD *et al.*, 1995).

Os microrganismos anaeróbios possuem várias reações na degradação de compostos tóxicos, tais como desalogenação redutiva, já citada anteriormente, de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos altamente clorados, redução de anéis aromáticos a estruturas aromáticas alicíclicas, e fissão do anel (BHATNAGAR & FATHEPURE, 1991).

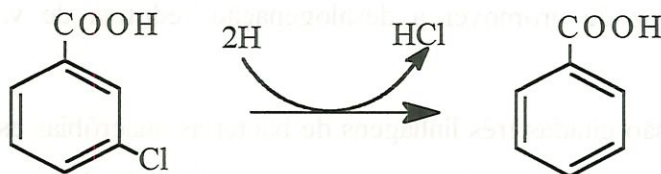
Segundo definições de MIKESSEL & BOYD (1986), a desalogenação redutiva, ou remoção de átomos de cloro diretamente do anel de compostos aromáticos, é um processo simples e importante, pois os produtos desalogenados são usualmente menos tóxicos e podem ser facilmente degradados sob condições aeróbias ou anaeróbias.

Estudos realizados por KENNES *et al.* (1996) permitiram concluir que a adição de sulfato, em acompanhamento com a razão de liberação do íon cloro do PCP, acelerou o processo de mineralização. Adição de molibdênio, um inibidor das bactérias redutoras de sulfato, inibiu a liberação de cloro da molécula e severamente a mineralização do PCP. Isto sugere o envolvimento de bactérias redutoras de sulfato na desalogenação e na mineralização. Em muitos casos, a desalogenação de diclorofenóis pode ser acoplada com a redução de sulfato (KOHRING *et al.*¹ *apud* DAMIANOVIC, 1997).

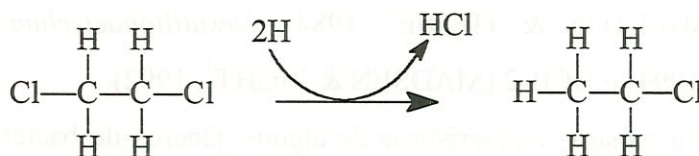
¹KOHRING, G.W.; ZHANG.; WIEGEL, J. (1989). Anaerobic dechlorination of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments in the presence of sulfate. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.55, n.10, p. 2735-2737 *apud* DAMIANOVIC, M.H.R.Z. (1997). Degradação de pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RHAF). São Carlos. 174p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Essencialmente, dois processos fazem parte do mecanismo global da desalogenação redutiva, como mostra a Figura 4 (MOHN & TIEDJE, 1992).

A: hidrogenólise de arila



B: hidrogenólise de alquila



C: redução vicinal

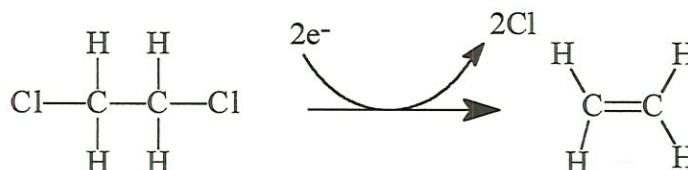


FIGURA 4 - Exemplos de desalogenação redutiva.

Fonte: MOHN & TIEDJE, 1992.

- 1) o primeiro processo, hidrogenólise, é a substituição do halogênio da molécula por um átomo de hidrogênio (FIGURA 4A e B);
- 2) o segundo processo, redução vicinal (dihaloeliminação), é a remoção de dois halogênios dos átomos de carbono adjacentes com a formação de uma ligação adicional entre os átomos de carbono (FIGURA 4C).

Devido à pequena disponibilidade de microrganismos com respiração desalogenante, ou seja, que utilizam compostos halogenados para crescimento em cultura pura, conclui-se que esses tipos de microrganismos apresentam limitado espectro de doadores de elétrons que suportam crescimento. Hidrogênio molecular, formiato e acetato são, provavelmente, os doadores de elétrons mais promissores para enriquecimento de microrganismos com respiração desalogenante (HOLLIGER & SCHUMACHER, 1994).

A desalogenação redutiva foi verificada com grande êxito por culturas puras, como no estudo de STEVENS *et al.* (1988), onde a linhagem DCB-1, que é uma bactéria anaeróbia estrita, e que foi isolada à partir de lodo anaeróbio enriquecido utilizado na degradação de 3-clorobenzoato, é a primeira espécie anaeróbia, em cultura pura, capaz de promover a desalogenação redutiva de vários compostos aromáticos.

À seguir, são citadas três linhagens de bactérias anaeróbias estritas que foram isoladas pela capacidade de desalogenar a molécula de PCP, de acordo com citações feitas por CHRISTIANSEN & AHRING (1996); *Desulfomonile tiedjei* (DEWEERD *et al.*¹, 1990; SHELTON & TIEDJE², 1984), *Desulfitobacterium dehalogenans* (UTKIN *et al.*³, 1994) e DCB-2 (MADSEN & LICHT⁴, 1992).

A Tabela 6 mostra características de alguns gêneros de bactérias capazes de desalogenar redutivamente.

¹DEWEERD K.; MANDELCO L.; TANNER R.S.; WOESE C.R. & SUFLITA J.M. (1990). *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium. Arch. Microbiol. v.154, p.23-30. ²SHELTON D.R. & TIEDJE J.M. (1984). Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. Appl. Environ. Microbiol. v.48, p.23-30. ³UTKIN I; WOESE C.; WIEGEL J. (1994). Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. Int. J. Syst. Bacteriol., v.44, p.612-619. ⁴MADSEN T & LICHT D. (1992). Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol-transforming bacterium. Appl. Environ. Microbiol. v.58, p.2874-2878 *apud* CHRISTIANSEN, N. & AHRING, B.K. (1996). Introduction of a de novo bioremediation activity into anaerobic granular sludge using the dechlorinating bacterium DCB-2. Antonie van Leeuwenhoek, v.69, p.61-66.

TABELA 6 - Características dos gêneros de bactérias capazes de desalogenar redutivamente

Propriedades	Gêneros ^a			
	<i>Dehalobacter</i> sp	<i>Desulfomonile</i> sp	<i>Desulfitobacterium</i> sp	<i>Dehalospirillum</i> sp
Doadores de elétrons	H ₂	H ₂ , formiato, piruvato, lactato, benzoato	H ₂ , formiato, piruvato, lactato	H ₂ , formiato, piruvato, lactato, etanol, glicerol
Aceptores de elétrons	tricloroetileno, tetracloroetileno	metaclorobenzoatos, SO ₄ ²⁻ , SO ₃ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻	ortoclorofenóis, NO ₃ ⁻ , fumarato, SO ₃ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S ⁰	tricloroetileno, tetracloroetileno, NO ₃ ⁻ , fumarato
Outras propriedades ^a	Capacidade de crescimento como autótrofos, sem citocromos	Contém citocromo c ₃ , requer fonte de carbono orgânico	Crescimento mais rápido (g=3,5h), requer fonte de carbono orgânico	Contém citocromos do tipo b e c, cresce muito rápido (g=2,5h), requer fonte de carbono orgânico
Filogenia	Bactéria Gram positiva de baixo conteúdo de GC	Relacionado a Proteobacteria δ	Bactéria Gram positiva de baixo conteúdo de GC	Relacionado a Proteobacteria γ

Fonte: MADIGAN *et al*, 1997

^a Todos os organismos são anaeróbios obrigatórios

LARSEN *et al.* (1991), em seus estudos sobre a desalogenação anaeróbia do PCP sob condições termofílicas, adicionou PCP juntamente com etanol, o qual foi usado como solvente. As altas taxas de desalogenação alcançadas, onde houve a adição de altas concentrações de PCP, poderia ser esclarecida através do efeito positivo gerado pela introdução do etanol, reforçando assim os resultados obtidos pelos estudos de GIBSON & SUFLITA (1990), que mostraram que a adição de ácidos orgânicos de cadeia curta ou álcoois estimulou biodegradação anaeróbia de compostos cloroaromáticos. Em seus estudos, os ácidos orgânicos de cadeia curta e etanol tiveram um efeito estimulador na desalogenação anaeróbia do ácido 2,4,5 triclorofenoxi-acético, em condições metanogênicas.

DAMIANOVIC (1997), em seu estudo de degradação do PCP em Reatores Anaeróbios Horizontais de Leito Fixo (RHALF), concluiu que é possível tratar substratos contendo PCP no intervalo de concentração de 0,2 a 8,0 mg/L de PCP. As fontes de carbono: glicose e ácidos acético e fórmico podem servir como doadores de elétrons necessários para as reações de desalogenação redutiva. O autor também observou em seus estudos que houve a seleção de microrganismos, possivelmente aqueles envolvidos no processo de degradação de clorofenóis.

Estudos realizados por MIKESSEL & BOYD (1986) avaliaram o potencial de lodos anaeróbios aclimatados por um longo período em monoclorofenóis (MCPs), na degradação de PCP. Verificou-se que PCP foi degradado na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pela atividade de cada lodo aclimatado em monoclorofenóis. A degradação foi mais rápida nos lodos previamente alimentados com 2-monoclorofenol, sendo o PCP degradado num período de três dias. Os lodos adaptados a 3 e 4-monoclorofenóis degradaram o PCP mais vagarosamente, respectivamente nos períodos de 12 e 9 dias. Os resultados sugeriram que os átomos de cloro na posição orto foram removidos mais rapidamente do que os átomos de cloro nas posições meta e para. Os autores supuseram que os resultados foram também devido a diferenças no número de células entre os lodos aclimatados.

LARIZZATTI (1997), estudou a degradação do PCP por consórcios metanogênicos enriquecidos. Esses consórcios já haviam sido expostos previamente ao PCP e inibidos numa concentração de PCP de 10 mg/L. Os consórcios foram

capazes de degradar o PCP na presença de aproximadamente 5 mg/L de PCP e dos ácidos acético, butírico e propiônico, bem como do metanol, com concomitante produção de metano nas condições estudadas.

LARSEN *et al.* (1991) estudaram o comportamento de diferentes inóculos de ecossistemas naturais e digestores anaeróbios na desalogenação anaeróbia termofílica do pentaclorofenol. Inóculos foram coletados de oito ambientes anaeróbios na Dinamarca: três amostras foram lodos de esgoto de diferentes digestores anaeróbios trabalhando à 35-37°C, lodo estável de um reator anaeróbio termofílico em escala de laboratório (60°C), amostra de sedimento de um brejo à 15°C, duas amostras de diferentes sedimentos de água doce (10-15°C), lodo de um reator termofílico (55°C) digerindo esterco de gado. As amostras foram enriquecidas em PCP e fenol. O PCP foi diluído em etanol e sua concentração final no meio foi de 7,5 ou 37,5 µM. As porcentagens de remoção do PCP para as amostras depois de oito meses de incubação foram: brejo e sedimento de água doce (PCP quase que totalmente removido), sedimento de curso de água doce (80%), esterco termofílico (68%), lodos de esgoto (remoção entre 7 a 17%), lodo termofílico (2,8%). Concluiu-se, nesse trabalho, que o potencial de desalogenação a 50°C, geralmente é muito maior em ambientes anaeróbios naturais (lagos, rios, sedimento de brejo e esterco de gado) do que em lodo de esgoto, o qual é mais provável ter sido previamente exposto a clorofenóis.

A degradação de compostos halogenados pode ser realizada também por grânulos anaeróbios, cuja descrição foi citada no item 3.2 deste capítulo.

No trabalho realizado por KENNES *et al.* (1996), analisou-se o comportamento de grânulos anaeróbios que degradavam PCP, desenvolvidos em escala de laboratório em reatores anaeróbios de fluxo ascendente e mantidos nos reatores a 35°C. Os grânulos foram rompidos, e obteve-se uma suspensão de células que foi usada como inóculo. Os testes foram realizados em frascos de soro, onde a suspensão celular foi alimentada com um meio contendo PCP, metanol, acetato, propionato e butirato. A liberação dos íons cloro da molécula do PCP foi medida em três diferentes condições; anaeróbias com células vivas, anaeróbias com células autoclavadas (mortas) e aeróbias com células vivas. Observou-se, durante o estudo,

que nenhum íon cloro foi liberado e nenhuma remoção de PCP aconteceu nos frascos contendo células autoclavadas. Sob condições aeróbias, a remoção de PCP foi muito pobre e não mostrou quantidade significativa de íon cloro liberado. Rápida remoção de PCP e liberação de íons cloro ocorreu nas condições anaeróbias com células ativas. Estes resultados indicaram que a remoção do PCP e a liberação de íons cloro foi mediada por atividade microbiana, já que nenhum íon cloro foi liberado por células autoclavadas sob condições anaeróbias.

Uma bactéria estritamente anaeróbia DCB-2 que é capaz de degradar PCP foi imobilizada em um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB), reator que continha grânulos estéreis. As bactérias formaram uma estrutura em forma de rede dentro dos grânulos, demonstrando que os grânulos poderiam possuir habilidades específicas, tais como uma atividade desalogenante, e ao mesmo tempo apresentar um alto desempenho. O PCP foi degradado e transformado em 3,4,5-triclorofenol no reator em que DCB-2 foi introduzida no lodo granular. Um reator controle que continha apenas grânulos não inoculados com a DCB-2, não ocorreu a desalogenação do PCP, indicando que o desempenho no reator inoculado foi devido a bactéria introduzida (CHRISTIANSEN & AHRING, 1996).

Grânulos anaeróbios que degradam PCP com atividade específica de remoção de PCP até 14,6 mg/g SSV.d, foram obtidos em escala de laboratório, em um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo a 28°C. Os inóculos do biorreator foram de dois tipos; grânulos que degradavam AOV desenvolvidos em uma mistura de AOV consistindo de acético, propiônico e butírico e culturas mistas anaeróbias desenvolvidas de amostras coletadas de locais contaminados e lodos enriquecidos com PCP. A remoção de PCP alcançada pelos grânulos foi maior que 99%. As análises microscópicas desses grânulos desenvolvidos que possuem a capacidade de degradar PCP revelaram a presença predominante do gênero *Methanothrix*, uma bactéria em formato de bacilo. Algumas células do gênero *Methanothrix* cresceram como longos filamentos, e outras cresceram como bacilos formando filamentos de três ou cinco células. Os gêneros *Methanosarcina* e *Methanobacterium* foram também observados como prevaletentes nos grânulos (WU *et al.*, 1993).

Estudo à respeito da diversidade microbiana na presença de PCP foi realizado por SATO¹ *apud* McALLISTER (1996), que estudou a predominância de diferentes grupos de bactérias no solo tratados com PCP e solos não tratados. Foi constatado que a presença de PCP modificou a comunidade bacteriana no solo, selecionando apenas grupos bacterianos que cresciam na sua presença. A morfologia observada e predominante na presença do PCP foi uma bactéria Gram negativa, de formato cocóide, com flagelos. A mesma amostra de solo sem PCP, continha uma maior diversidade de microrganismos.

3.5 - A vida microbiana termófila

A temperatura é um dos mais importantes fatores ambientais que influenciam no crescimento e a sobrevivência de qualquer organismo vivo. Os termófilos são genericamente definidos como “organismos que vivem sob elevadas temperaturas”. Quão elevadas são essas temperaturas? Tal resposta, certamente, dependerá do grupo de organismos em questão. Dessa maneira, segundo BROCK (1986), “um organismo termófilo é aquele capaz de crescer sob temperaturas elevadas”. Posteriormente, em aprimoramento à sua própria definição, BROCK (1986) escreveu “um organismo termófilo é aquele capaz de viver próximo ou à temperatura máxima do grupo taxonômico do qual faz parte”. Essa colocação tem a vantagem de enfatizar a distinção taxonômica dos termófilos nos diferentes grupos de organismos, apesar de nada indicar sobre as faixas de temperatura mais adequadas ao crescimento específico dos grupos (VAZOLLER, 1994).

Além de uma temperatura máxima que os organismos suportam para a sua sobrevivência, existem também uma temperatura mínima para o crescimento, abaixo da qual não se desenvolvem, uma temperatura ótima, na qual o crescimento é mais rápido. A estas três temperaturas dá-se o nome de temperaturas cardinais, e são características de cada tipo de organismo (VAZOLLER, 1995).

¹SATO, K. (1985). Effect of a pesticide, pentachlorophenol (PCP) on soil microflora. II Effect of PCP on bacterial flora in soil percolated with glycine or water. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v.31, p. 197-210 *apud* McALLISTER, K.A.; LEE, H.; TREVORS, J.T. (1996). Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation*, v.7, p.1-40.

De acordo com citações feitas por VAZOLLER (1995), a possibilidade de crescimento bacteriano, em amplas oscilações de temperatura, foi verificada nas Archaea metanogênicas termófilas. A linhagem *Methanobacterium thermoautotrophicum* apresenta um crescimento incomum a 22°C, desde que extrato de levedura ou extratos de lodos de sistemas anaeróbios sejam adicionados ao meio de cultivo. Pela conclusão de WIEGEL (1990), o comportamento da metanogênica revelou que um microrganismo, com temperatura ótima de crescimento em torno de 68 a 69°C, pode crescer em faixas mesofílicas, se a atividade celular for mantida pela adição de compostos essenciais não sintetizados pela célula a menores temperaturas. Assim, o suprimento externo de um composto essencial ao microrganismo termófilo, cujo metabolismo celular de produção do composto tenha sido bloqueado pelo decréscimo da temperatura, possibilita o desenvolvimento e manutenção de termófilos a temperaturas extremamente inferiores às suas ideais. Os primeiros microrganismos termófilos foram descritos no final do século passado, quando verificou-se o predomínio de espécies do gênero *Bacillus*. A linhagem *Clostridium thermocellum* foi a primeira bactéria anaeróbia termófila descrita (WIEGEL, 1990).

Os organismos termófilos compreendem representantes dos Domínios Bacteria e também Archaea. Archaea é um Domínio em que os membros podem estar divididos dentro de três grupos: - halófilos: os quais crescem em ambientes altamente salinos; - metanogênicos: os quais produzem metano em ambientes anóxicos reduzidos; - Archaea que metabolizam enxofre, as quais são obrigatórias ou facultativas e que oxidam ou reduzem algumas formas de enxofre para o seu crescimento. Muitas Archaea não são termófilas (ex: as halófilas), mas a maioria dos representantes desse Domínio (com algumas exceções), crescem em temperaturas altamente extremas (KELLY & DEMING, 1988).

3.5.1 - Termoestabilidade das moléculas e das estruturas celulares dos microrganismos anaeróbios termófilos

A uma certa temperatura, proteínas, ácidos nucléicos e outros componentes celulares são sensíveis, podendo ser irreversivelmente desnaturados. Assim, os componentes celulares das bactérias termófilas possuem características de tolerância aos efeitos das temperaturas elevadas, configurando-se como componentes termoestáveis (MADIGAN *et al.*, 1997; ANTRANIKIAN, 1990).

LANGWORTHY & POND (1986); RUSSEL & FUKUNAGA (1990), relataram que uma das mais importantes adaptações dos termófilos está na composição lipídica das membranas. Os organismos termófilos são geralmente Gram-positivos, constatando-se o predomínio de glicolipídeos (cerca de 60%), principalmente de diglicosigliceróis, glicosimidil-tetra-hidróxi-bacterioplanos e tetraglicosildiácilgliceróis. As Archaea termófilas que possuem éter-lipídeos na membrana, contêm maiores proporções de finatil-éter glicolipídeos do que suas homólogas mesófilas, e em muitos casos, possuem maiores quantidades de glicolipídeos na superfície das membranas do que as Archaea termófilas. Tem-se especulado que o elevado conteúdo de glicolipídeos aumenta a capacidade de ligações de hidrogênio nas camadas da membrana celular, estabilizando-a sob altas temperaturas através de interações adicionais com componentes externos da parede celular.

Aspectos interessantes são descritos por RUSSEL & FUKUNAGA (1990), em relação às Archaea metanogênicas termófilas, que possuem di-éteres e tetra-éteres nos lipídios das membranas celulares. No gênero *Methanobacterium*, com crescimento ótimo à temperatura de 65°C, foram determinadas iguais quantidades dos dois tipos de lipídios, e no gênero *Methanothermus*, que se desenvolve bem à temperatura de 85°C, o conteúdo de tetra-éteres nos lipídeos foi de 80 a 90%. Provavelmente esta camada lipídica auxilia na estabilidade da membrana termofílica. As metanogênicas mesófilas raramente apresentam tetra-éteres nos lipídeos das membranas celulares.

3.5.2 - Aplicação de microrganismos termófilos na digestão anaeróbia

O tratamento anaeróbio oferece um número de vantagens no tratamento de resíduos orgânicos altamente poluentes tais como, a habilidade para tratar altas cargas orgânicas, produção de uma pequena quantidade de lodo e produção de gás metano como uma proveitosa fonte de energia (YAMAGUCHI *et al.*, 1991).

As possibilidades da tecnologia do tratamento anaeróbio poderiam ser estendidas se o processo pudesse também ser aplicado a altas temperaturas. Particularmente quando a água residuária é descarregada a altas temperaturas, o tratamento termofílico pode ser uma alternativa atraente. Além disso, nas faixas termofílicas (>45°C), as reações se processam muito mais rápido do que através de condições mesofílicas (25-40°C). Desse modo, os potenciais de carga de biorreatores anaeróbios são significativamente mais altos (HARRIS & DAGUE¹ *apud* VAN LIER *et al.* 1996).

Durante as duas últimas décadas, o interesse nas temperaturas termofílicas para o tratamento de resíduos e águas residuárias tem aumentado significativamente, especialmente durante a digestão anaeróbia de resíduos sólidos em que o processo termofílico se mostrou superior, quando comparado com os processos mesofílicos nos pontos que dizem respeito ao balanço energético e rendimento (CECCHI *et al.*² *apud* AHRING, 1994). Contudo, segundo os autores, o período de partida para plantas termofílicas pode ser longo, mais que um ano, até que se alcance uma produção de gás em níveis aceitáveis. O maior problema, com respeito à partida de reatores termofílicos, é o baixo número de microrganismos termofílicos em materiais orgânicos tais como diferentes tipos de resíduos. O problema das baixas populações microbianas termofílicas pode ser solucionado quando o inóculo termofílico está disponível. Uma

¹HARRIS, W.L.; DAGUE R.R. (1993). Comparative performance of anaerobic filters at mesophilic and thermophilic temperatures. *Water Environ. Res.*, v.65, p.764-771 *apud* van LIER, J.B.; MARTIN, J.L.S.; LETTINGA, G. (1996). Effect of temperature on the anaerobic thermophilic conversion of volatile acids by dispersed and granular sludge. *Wat. Res.*, v.30, n.1, p.199-207.

²CECCHI, F.; MATA ALVAREZ, J.; VERSTRAETE, W. (1992). Mem. Int. Symp. Anaerobic Digestion Solid Waste, Venice, Italy. Thome-Kozmiensky (ed.), EF-VERLAG für Energie-und Umwelttechnik GmbH, Munchen, p.595-600 *apud* AHRING, B.K. (1994). Status on science and application of thermophilic anaerobic digestion. *Wat. Sci. Tech.*, v.30, n.12, p.241-249.

estratégia para a obtenção deste inóculo é de extrema importância para o sucesso da adoção de sistemas termofílicos (AHRING,1994).

Trabalhos feitos por LARSEN *et al.* (1991) mostraram como já citado, o potencial para a biodegradação anaeróbia termofílica do PCP, a 50°C, pelo uso de inóculos de diferentes ecossistemas. A alta temperatura foi escolhida para fazer uso de algumas das vantagens ligadas às condições termofílicas, tais como, alta taxa metabólica e baixa produção de lodo.

Segundo AHRING (1994), quatro grandes implantações termofílicas para a digestão de esterco e resíduo orgânico industrial têm sido construídas nos últimos cinco anos na Dinamarca, como parte de um programa de plantas de larga escala termofílicas para síntese de biogás. As plantas termofílicas tratam 450 toneladas de matéria orgânica por dia e são operadas de 52 a 56°C.

De acordo com os resultados obtidos pelo autor anteriormente citado (Tabela 7), pode-se observar que, quando comparadas as concentrações de ácidos orgânicos voláteis no efluente das plantas termofílicas com os de plantas mesofílicas, nenhuma diferença óbvia pode ser observada. Valores de ácidos orgânicos voláteis muito baixos foram encontrados por um longo período de operação das plantas termofílicas operadas sob elevadas temperaturas.

TABELA 7 - Concentrações dos ácidos orgânicos voláteis de algumas plantas de biogás dinamarquesas, em escala industrial

Plantas	Temperatura do processo	Valores médios de AOV nos reatores (mM)			
		Acético	Propionico	Iso-butírico	Butírico
Fangel	37-38°C	23,4	2,3	0,24	0,15
Ribe	53°C	7,5	5,9	0,20	-
Lintrup	38°C	4,7	0,22	-	-
Revninge	35-37°C	5,9	0,30	-	-
V.Hjermislev	36-38°C	1,1	0,25	0,12	0,06
Skovsgard	38°C	15,6	4,50	0,32-1,6	0,32-0,57
Vegger	55-56°C	8,5	1,1	0,1	0,1
Sinding-Orre	51-52°C	13,7	9,6	0,5	0,2

AOV - ácidos orgânicos voláteis

Fonte: AHRING (1994)

As experiências das plantas dinamarquesas de larga escala na produção de biogás mostram claramente que as plantas termofílicas não são menos estáveis do que as mesofílicas (AHRING, 1994).

No Brasil tem-se um exemplo do uso da digestão anaeróbia termofílica; a usina São Martinho, que é a maior produtora de álcool do Brasil ($3,4 \times 10^8$ L/ano), com produção de etanol de aproximadamente $1,2 \times 10^{10}$ L por ano, gerando dessa maneira grandes quantidades de vinhaça ($1,5 \times 10^{11}$ L/ano). A disposição da vinhaça no ambiente, sem prévio tratamento, traz sérios riscos ao meio ambiente.

A digestão anaeróbia termofílica da vinhaça pode gerar gás metano, que serve como combustível para veículos ou para gerar eletricidade. Considerando as altas temperaturas em que a vinhaça é produzida ($\cong 90^{\circ}\text{C}$) e as vantagens das bactérias termofílicas, a Usina São Martinho decidiu desenvolver uma digestão anaeróbia termofílica em reatores UASB de larga escala. O objetivo foi de pelo menos duplicar a taxa orgânica máxima usadas nos reatores mesofílicos do tipo UASB que também tratam vinhaça, e diminuir custos com o aquecimento. A granulação do lodo nos reatores termofílicos foi muito difícil de ser obtida. Por outro lado, após ser conseguida essa granulação, não houveram mais problemas com relação à estabilidade do processo termofílico; nestas condições, a conversão da matéria orgânica (72% de remoção) e a produção de biogás ($10 \text{ Nm}^3 \text{ gás/m}^3 \text{ r.dia}$) foram verificadas (SOUZA *et al.*, 1991).

3.6 - Técnicas empregadas ao estudo de bactérias anaeróbias termofílicas

3.6.1 - Manipulação das bactérias sob condições de anaerobiose

Os métodos descritos à seguir, foram usados no presente trabalho, para a manipulação dos anaeróbios estritos. Os procedimentos usados para estudar os termofílicos anaeróbios não foram diferentes daqueles descritos para os mesofílicos anaeróbios. Em relação ao cultivo dos termofílicos moderados anaeróbios estritos, não foram notadas técnicas especiais, a não ser aquelas já conhecidas que visam a retirada do oxigênio da atmosfera nos frascos experimentais e do meio de cultura, bem como a homogeneização dos frascos durante os ensaios, afim de promover a mistura da

atmosfera gasosa empregada, particularmente se o gás for substrato para o crescimento das culturas em estudo, ou usado para controlar o pH do meio (VAZOLLER, 1995).

VAZOLLER (1995), em sua revisão citou trabalhos de LJUNGDAHL & WIEGEL¹ (1986), que mostraram os procedimentos possíveis para a remoção do oxigênio e preparação de meios reduzidos, citando trabalho inicial de HUNGATE² (1950), que deram origem a técnica atualmente denominada “Técnica de Hungate” para a manipulação de anaeróbios estritos. Posteriormente, esta técnica sofreu modificações (BRYANT, 1972) e foi seguida pelo desenvolvimento de outros sistemas, como o emprego de tubos de ensaio para anaeróbios do tipo HUNGATE® da Bellco® Glass Inc. ou frascos de antibiótico e de soro fechados sob pressurização gasosa.

A “Técnica de Hungate” (HUNGATE, 1969), é o procedimento básico empregado até hoje na maioria dos sistemas que visam a remoção de traços de oxigênio dos gases a serem utilizados na atmosfera de frascos e tubos de ensaio durante o cultivo de anaeróbios estritos. Assim, foi adaptada uma coluna de vidro preenchida com limalha de ferro, que aquecida e previamente lavada com fluxo de 100% hidrogênio, mantém o ferro em seu estado reduzido. Os gases como nitrogênio, dióxido de carbono e hidrogênio, ou misturas dos mesmos, ao passarem por esta coluna, antes de serem introduzidos nos frascos com meio de cultivo, são descontaminados de traços de oxigênio. A limalha contendo ferro em seu estado reduzido reage com o oxigênio presente no gás introduzido, retendo-o no sistema. Após a passagem dos gases através da coluna, os gases são introduzidos nos frascos com meio de cultivo através do sistema de distribuição simultânea de gases utilizado para a manutenção das condições de anaerobiose. Esse sistema consiste de uma

¹LJUNGDAHL, L. & WIEGEL, J. (1986). Working with anaerobic bacteria. In Manual of industrial microbiology and biotechnology. Eds. Al. Demain e N.A Solomon, Washington. American Society Microbiology, p.84-96. ²HUNGATE, R.E. (1950). The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. Bacteriol. Reviews, v.14, p.1-49 *apud* VAZOLLER, R.F. (1995). Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos, 259p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo

canalização com 3 saídas de gases simultâneas e controle de fluxo por válvulas de agulha, baseado no sistema desenvolvido por BALCH *et al.* (1977). Em cada saída é instalada uma mangueira com cerca de 30 cm apropriada para gases que, na extremidade oposta, estava instalada uma seringa de 3 mL. Através das mangueiras, seringas e agulhas faz-se passar um fluxo gasoso a ser inserido nos frascos. A troca de atmosfera dos reatores é feita antes da inoculação dos meios de cultivo e do inóculo e é feita por uma bomba de vácuo que permite a aplicação de pressão negativa no interior dos frascos simultaneamente a pressão positiva feita pela introdução dos gases usados para manter a atmosfera dos frascos.

A técnica de MILLER & WOLLIN¹ *apud* VAZOLLER (1995), foi desenvolvida para a preparação de um meio de cultivo basal sob fluxo gasoso, seguida pela distribuição do meio em frascos de antibiótico ou de soro, fechados com batoque de borracha e lacre de alumínio. A adição de soluções com fontes de carbono, vitaminas, agente redutor e outras, assim como o inóculo, é feita após a autoclavação desse meio de cultivo, através de seringas de insulina, ou de seringas com volumes maiores, se necessário. As soluções adicionadas após a autoclavação são também mantidas sob anaerobiose.

Segundo observações feitas por LJUNGDAHL & WIEGEL² *apud* VAZOLLER (1995), a retirada física do oxigênio dos frascos de ensaio não é suficiente para manter a anaerobiose no meio de cultivo. Para isso, podem ser utilizados agentes redutores do meio, tais como sulfeto de sódio, cisteína, tiosulfato de sódio e ditionito de sódio. Com o uso de soluções contendo os agentes redutores (soluções redutoras) garante-se potenciais de oxi-redução bastante baixos, como os requeridos pelas metanobactérias, da ordem de -330 mV. As soluções redutoras mais comuns empregadas nos meios de cultivo para bactérias metanogênicas e algumas não-metanogênicas são as constituídas pela mistura de sulfeto de sódio e cisteína ou

¹MILLER, T.L.; WOLIN, M.J. (1974). A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Applied Microbiology*, v.27, p.985-987. ²LJUNGDAHL, L.; WIEGEL, J. (1986). Working with anaerobic bacteria. In *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. Eds. Al. Demain e N.A Solomon, Washington. *American Society Microbiology*, p.84-96 *apud* VAZOLLER, R.F. (1995). Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos, 259p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.

somente por sulfeto de sódio. As soluções são preparadas mais concentradas para adição posterior ao meio de cultivo autoclavado, através de alíquotas, e para tanto são estocadas sob atmosfera inerte de 100% nitrogênio. O indicador de potencial de oxidação-redução mais comum foi indicado por HUNGATE (1969), a resazurina, que com um potencial redox de -110 mV é completamente incolor.

Alguns problemas podem estar relacionados a metodologia de isolamento e cultivo de termófilos, segundo estudos realizados por WIEGEL (1986); - um aumento da evaporação do meio em frascos não selados adequadamente; - baixa solubilidade dos gases devido ao aumento da temperatura; - instabilidade do ágar em meios de cultivo incubados a temperaturas muito elevadas (65 a 70°C); - caramelização de açúcares na presença de fosfatos; - contaminação do meio por esporos bacterianos termófilos altamente resistentes ao calor.

Trabalho de LARSEN *et al.*(1991), já citado, pode fornecer informações à respeito do enriquecimento e cultivo de anaeróbios termófilos na presença do PCP. Nesse trabalho, as culturas foram enriquecidas a 50°C em PCP e fenol. PCP, soluções estoque de etanol, foram adicionadas no meio anaeróbio usando uma micro-pipeta. Controles sem adição de PCP ou fenol foram feitos para cada série. Todos os experimentos foram feitos com duplicatas em frascos de soro de 50 mL contendo 25 mL de meio mineral e 5 mL de amostra de lodo como inóculo. Extrato de levedura foi adicionado ao meio mineral. Os frascos de soro foram selados com borracha de butila e batoques de alumínio. A fase gasosa foi uma mistura de 80% N₂ e 20% CO₂. As concentrações de PCP foram determinadas Hewlett Packard 5890 série II, um cromatógrafo a gás equipado com um detector de captura de elétrons e uma coluna capilar Megabore DB-5. O gás de arraste foi o N₂. Picos foram identificados e quantificados injetando 1 µL de extrato de n-pentano de um padrão autêntico preparado do mesmo modo que as amostras a serem inoculadas.

3.6.2 - Enriquecimento e isolamento das culturas metanogênicas e não metanogênicas

O enriquecimento de bactérias anaeróbias termófilas pode ser facilmente obtido empregando-se as técnicas para a manipulação de anaeróbios estritos. Segundo WIEGEL (1986), os cultivos e sub-cultivos durante o enriquecimento foram sempre facilitados quando os meios já prontos eram ligeiramente aquecidos antes da inoculação.

Segundo DUBORGUIER (1987), a base do enriquecimento de culturas é a utilização da fonte energética específica dos diferentes grupos bacterianos. Além disso, o meio basal dos anaeróbios deve conter as fontes nitrogênio, fósforo, enxofre. Os sais são, em geral, os de sódio, potássio, magnésio e cálcio, e os elementos traço constituídos basicamente por metais, incluem representantes como o ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio, alumínio, entre outros. As fontes de vitamina compreendem a faixa conhecida para os microrganismos, notadamente a vitamina B. Fatores de crescimento ou estimulatórios são encontrados no extrato de levedura e nos fluídos de biodigestores e do rúmen de animais. O controle do pH nos meios, pode ser feito pela presença do dióxido de carbono somado a soluções de sais inorgânicos e orgânicos como, bicarbonato, fosfato, entre outros. O autor também citou a importância do uso de diferentes fontes orgânicas no estudo de culturas presentes em lodos granulados mesófilos. O enriquecimento, isolamento e contagens bacterianas podem incluir fontes como glicose, ácidos graxos e etanol, cujas concentrações utilizadas variam entre 20 e 40 mM..

Estudos de isolamento de culturas bacterianas termófilas foram feitos para a verificação do efeito da oscilação de temperatura no processo de isolamento. WIEGEL (1986). Não foi observado nenhum caso em que decréscimos da temperatura nas amostras para o isolamento dos microrganismos termófilos causasse efeitos fatais às células. Por exemplo, a amostra do sedimento lacustre do Yellowstone Park, na qual a linhagem *Methanobacterium. thermoautotrophicum* foi observada, esteve estocada por 5 anos em uma câmara fria, entre 0 e 6°C. As

contagens de termófilas metanogênicas na amostra, pela técnica do NMP, indicaram uma alteração muito pequena no número total de bactérias por mais de 3 anos sob refrigeração. Por outro lado, o autor concluiu que generalizar as respostas bacterianas, quanto à tolerância a alterações de temperatura, não é conveniente, pois as faixas de oscilações de temperatura que não ocasionam efeitos destrutivos às células podem variar amplamente, entre diferentes espécies.

AHRING & WESTERMANN (1987) usaram no enriquecimento de culturas metanogênicas do tipo TAM (Thermophilic Acetate-utilizing Methanogen), frascos de soro de 1L contendo 750 mL de meio, fechados com rolhas de borracha de butila com dispositivos para a alimentação, retirada de amostras e liberação de gases em frascos coletores. O enriquecimento foi iniciado com 740 mL de meio de cultivo mineral contendo 50 mM de acetato de sódio e 10 mL de lodo oriundo de um biodigestor termofílico de lodo de esgoto, operado a 60°C. O pH foi sempre mantido em 7,3. O isolamento da cultura metanogênica acetoclástica foi realizada após 8 meses de enriquecimento, através de diluições decimais no mesmo meio mineral contendo 50 mM de acetato e adicionado de 0,1 g/L de vancomicina. A mais alta diluição que apresentou crescimento e produção de metano (10^{-7}), após 3 a 4 semanas, foi utilizada para outra série de diluições decimais, suficiente para a obtenção da cultura pura. Foi necessário um longo período de enriquecimento (8 meses) para o estabelecimento de uma cultura acetoclástica típica.

3.6.3 - Técnicas microscópicas para a identificação de Archaea metanogênicas e bactérias não-metanogênicas

As técnicas para a identificação de espécies de culturas anaeróbias metanogênicas empregam, principalmente, análises microscópicas da morfologia das células, após a obtenção das culturas em meios específicos. A microscopia comum, de contraste de fase, de epifluorescência e a laser, bem como a de alta resolução por varredura e transmissão, são ferramentas essenciais para a determinação do tamanho,

forma e constituição das paredes celulares das diferentes espécies bacterianas (VAZOLLER, 1995).

A identificação das espécies metanogênicas pela microscopia de fluorescência se faz pela presença de duas coenzimas específicas a essas bactérias, a F_{420} e a F_{350} , que são responsáveis pela fluorescência de células metanogênicas jovens e velhas, quando submetidas a determinados comprimentos de onda luminosos (420 e 350 nm). As culturas bacterianas, na fase inicial de crescimento, apresentavam maior fluorescência do que células na fase estacionária. A excitação luminosa a 420 e 350 nm resulta em cores amarelo-esverdeadas e azuladas, respectivamente (DODDEMA & VOGELS, 1978).

A microscopia de fluorescência tem sido amplamente utilizada na análise direta de lodos anaeróbios provenientes de sedimentos aquáticos e biodigestores (VAZOLLER, 1995).

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Introdução

Dentro do propósito do trabalho, foi escolhido e estudado um lodo granulado anaeróbio proveniente de um biodigestor anaeróbio termofílico de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), da Usina São Martinho, Pradópolis-S.P.

O presente estudo compreendeu a avaliação do potencial do lodo termófilo na degradação do composto pentaclorofenol (PCP), bem como o isolamento de culturas bacterianas capazes de realizar essa degradação.

Antes de ser dado início ao trabalho experimental, o lodo coletado foi armazenado sob refrigeração, à temperatura de 7°C, durante 19 dias. A coleta do lodo foi realizada no final da safra da Usina (Abril/97), durante o início da operação do biodigestor. O exame microscópico do lodo foi realizado após a coleta.

Os ensaios de enriquecimento (primeiro, segundo e terceiro ensaios) foram conduzidos sob condições anaeróbias. O meio usado foi o meio basal Zinder (ZINDER *et al*¹ *apud* VAZOLLER, 1995) acrescido de fontes orgânicas e soluções de vitaminas, redutora e bicarbonato, em frascos de 250 mL, sob agitação a 55±2°C. Os três primeiros ensaios foram realizados para avaliar a capacidade do lodo na degradação do composto pentaclorofenol (PCP).

¹ZINDER, S.H.; CARDWELL, S.C.; ANGUISH, T.; LEE, M.; KOCH, M. (1984). Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester: *Methanotrix* sp. as important acetoclastic methanogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.47, p.796-807 *apud* VAZOLLER, R.F. (1995). Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos, 259p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.

No quarto ensaio, que correspondeu ao de isolamento de culturas hábeis na degradação do PCP, o procedimento adotado foi a diluição decimal seriada. O meio de cultura utilizado nas diluições decimais seriadas foi o de Zinder (ZINDER *et al*¹ *apud* VAZOLLER, 1995), acrescido de fontes orgânicas e soluções de vitaminas, redutora e bicarbonato e o isolamento das colônias foi feito em tubos Bellco®, indicados para o cultivo de anaeróbios estritos.

A Tabela 8 descreve os procedimentos empregados nos ensaios de enriquecimento. No enriquecimento das culturas bacterianas foram avaliados vários substratos e sua relação com o processo de desalogenação do PCP. Para o primeiro ensaio de enriquecimento as condições a que as culturas foram submetidas foram: presença de ácidos orgânicos voláteis (AOV - controles), ácidos orgânicos voláteis/PCP (AOV/PCP), glicose, glicose/PCP e PCP. As condições para o segundo ensaio foram mais restritas, isto é, o substrato glicose não foi mais testado devido as baixas concentrações de metano produzidas nessas condições (Anexo 3), mas o uso dos demais substratos foi mantido. Deu-se prosseguimento ao terceiro ensaio, mantendo-se o uso dos substratos ácidos orgânicos voláteis (AOV - controles), ácidos orgânicos voláteis/PCP (AOV/PCP) e introduzindo uma nova condição as culturas bacterianas que foi a solução de sulfato de sódio juntamente com os ácidos orgânicos voláteis (sulfato/AOV). Essas condições a que os ensaios de enriquecimento foram submetidos avaliou o potencial do lodo termófilo na degradação do composto halogenado (PCP).

¹ZINDER, S.H.; CARDWELL, S.C.; ANGUISH, T.; LEE, M.; KOCH, M. (1984). Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester: *Methanotrix* sp. as important acetoclastic methanogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.47, p.796-807 *apud* VAZOLLER, R.F. (1995). Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos, 259p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.

TABELA 8 - Condições das culturas anaeróbias enriquecidas em PCP a 55±2°C

Ensaio de enriquecimento	Condições dos ensaios
1	AOV* AOV/PCP Glicose* Glicose/PCP PCP
2	AOV* AOV/PCP PCP
3	AOV* AOV/PCP Sulfato / AOV

PCP: pentaclorofenol; AOV: ácidos orgânicos voláteis, *controles

4.2 - Equipamentos

4.2.1 - Sistema de distribuição simultânea de gases

Os ensaios foram realizados sob condições de anaerobiose estrita. Dessa maneira, gases como N₂ e a mistura N₂/CO₂ foram utilizados. O trabalho experimental foi conduzido na área de Microbiologia do Laboratório de Processos Anaeróbios do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (LPA-EESC-USP). A seguir, encontram-se indicados os equipamentos e materiais que compõem o sistema de distribuição simultânea de gases adaptado por VAZOLLER (1995) no LPA-EESC-USP, segundo o modelo do Laboratório do Dr. Stephen Zinder, do Departamento de Microbiologia da Cornell University (EUA).

Os botijões dos gases são instalados externamente ao laboratório de microbiologia e os gases são conduzidos para o interior do laboratório através de tubos de cobre de pequeno calibre. Para a remoção de oxigênio, os gases atravessam um cilindro de cobre com cerca de 20 cm de diâmetro, internamente preenchido por pedaços de cobre, segundo CG-Equipamentos Científicos. O cilindro é revestido por amianto e inserido em uma caixa de aço, que contém um sistema de aquecimento elétrico até 300°C.

No presente trabalho, os gases foram inseridos, nos frascos de cultivo, durante o preparo de meios de cultura e soluções, bem como durante os procedimentos de inoculação, empregando-se o sistema de distribuição simultânea de gases como mostrado no detalhe da Figura 5. No LPA-EESC-USP, o sistema é composto de quatro saídas de gases simultâneas. Em cada saída, foi instalada uma mangueira com cerca de 30 cm apropriada para gases e, na extremidade oposta, estava instalada uma seringa de vidro (tipo B&D) de 3 mL. Nas seringas, eram afixadas agulhas de insulina. Através dessas mangueiras, fazia-se passar o fluxo de gases a ser inserido nos frascos de cultivo. Fazendo parte desse sistema de distribuição simultânea de gases, havia uma bomba de vácuo (Figura 5 - detalhe) que possibilitava a troca de atmosfera nos frascos, ou seja, os frascos fechados com atmosfera interna de N_2 isenta de O_2 , eram submetidos, após autoclavação, a uma pressão negativa, e imediatamente preenchidos com uma mistura gasosa de N_2/CO_2 . Esse procedimento era repetido por 5 vezes (lavagem da atmosfera), e uma válvula de agulha permitia a escolha das duas condições, vácuo ou gás.

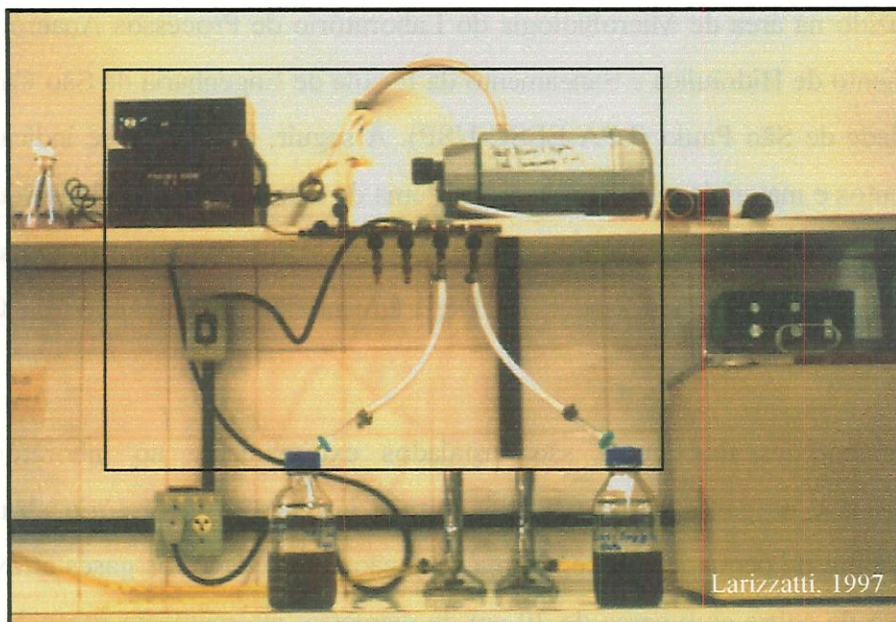


FIGURA 5 - Sistema de distribuição simultânea de gases



4.2.2 - Cromatógrafos

A avaliação da atividade bacteriana foi feita através de análises cromatográficas para determinação dos gases produzidos durante o processo metabólico. Foi utilizado cromatógrafo a gás, da marca Gow-Mac.

A cromatografia gasosa foi também usada na análise da degradação do organoclorado pentaclorofenol, assim como na detecção de intermediários dessa degradação. O cromatógrafo utilizado foi à gás HP5890 II. O volume de amostra injetado para a cromatografia gasosa do organoclorado foi de 1 μ L.

4.2.3 - Vidraria e outros materiais

Durante o desenvolvimento da parte experimental do presente trabalho, utilizam-se vidraria e materiais comuns aos procedimentos experimentais em Microbiologia, particularmente no Laboratório de Processos Anaeróbios.

Para o preparo das soluções-estoque utilizaram-se balões de vidro com fundo chato de 250 mL, e erlenmeyers de 1000 mL, bem como frascos de antibiótico de 30 mL, em que eram armazenadas as soluções. Esses frascos de antibiótico eram fechados com batoques de borracha de butila e lacres de alumínio, empregando-se um cravador manual de aço inoxidável.

Nos ensaios de enriquecimento foram usados frascos de soro de 250 mL, e nos de isolamento, tubos Bellco®. Os frascos de soro foram fechados com batoques de borracha de butila e lacres de alumínio e os tubos Bellco® com batoques de borracha de butila e tampas de rosca de plástico, perfuradas centralmente.

Pipetas de volumes entre 1 e 25 mL foram utilizadas tanto para a introdução de fluxo de gás como o N₂ nas soluções e meios de cultura, quanto para distribuição desses meios nos respectivos frascos ou tubos. Pipetas automáticas (EDP 2 - Rainin) foram utilizadas apenas para que fosse introduzida a solução de PCP nos frascos de

soro e tubos Bellco®. As adições das soluções-estoque eram feitas com seringas de insulina (Plastipak) e agulhas estéreis. A inoculação da amostra inicial foi feita com pipeta de 10 mL invertida, quando se utilizou o inóculo bruto recém trazido da Usina São Martinho, pois o inóculo possuía uma viscosidade bastante acentuada e o lodo era granuloso. Seringas de insulina com agulhas grossas (40x12) foram usadas no ensaio de isolamento das culturas. O meio de cultura, foi distribuído com pipetas de 25 e 10 mL.

Os gases utilizados foram N₂ 100% puro e mistura de 70% N₂ e 30% CO₂, fornecidos pela White-Martins.

As amostras para a avaliação qualitativa e quantitativa do gás metano na atmosfera dos frascos de cultivo foram coletadas usando-se seringas de 1 mL Hamilton-Gastight. Uma válvula com trava Mininert, colocada na extremidade entre a seringa e a agulha permitia a coleta de amostras da atmosfera dos frascos, sob as mesmas condições de pressão interna do sistema em estudo. As amostras líquidas para a análise do PCP por cromatografia gasosa eram coletadas através de uma seringa Hamilton de 10 µL. Antes da coleta dos gases e amostras líquidas, as tampas dos frascos e tubos eram molhadas em álcool 70% e flambadas.

4.3 - Procedimentos Experimentais

4.3.1 - Inóculo

Utilizou-se lodo granuloso oriundo de um reator anaeróbico termofílico (UASB-5000 m³) tratando vinhaça, da Usina de Açúcar e Alcool São Martinho, grupo Monte Sereno, Pradópolis-SP. O inóculo em questão foi coletado em um frasco plástico de 500 mL no período de entre-safra da produção de álcool, em Abril de 1997. Foram tomados os cuidados necessários durante a coleta para se evitar a contaminação da amostra pelo oxigênio, para que fosse mantida as condições de anaerobiose estrita. Dessa maneira, o frasco plástico foi ocupado pelo inóculo até o

seu limite e tampado imediatamente impedindo assim um contato maior com o oxigênio atmosférico.

4.3.2 - Composição e preparação das soluções-estoque e meio basal

O meio basal usado como fonte nutricional, foi o descrito por ZINDER *et al*¹ *apud* VAZOLLER (1995), que será denominado no âmbito desse texto, meio Zinder. Na Tabela 9 está descrito o meio Zinder e as demais soluções que fazem parte de sua composição.

TABELA 9: Composição do meio basal ZINDER.

Componentes	Quantidades - q.s.p. 1.000 mL de água destilada
NH ₄ Cl	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05 g
solução de resarzurina 0,1 %	1,0 mL
solução traço de metais	10,0 mL

Fonte: ZINDER *et al*¹. *apud* VAZOLLER, 1995

O meio Zinder foi preparado fervendo-se 1000 mL de água destilada. A fervura foi realizada para que o oxigênio dissolvido fosse despreendido. Os reagentes, que fazem parte da composição do meio Zinder, eram pesados em balança analítica, sendo as quantidades desses reagentes baseadas numa relação de proporcionalidade com a água. Os reagentes eram pesados em beakers pequenos, e adicionados à 500 mL de água destilada, seguindo a ordem apresentada na Tabela 9, a uma temperatura de aproximadamente 40°C. Posteriormente eram adicionados os outros 500 mL de água. Após homogeneização dos reagentes, um fluxo de 100% N₂

¹ZINDER, S.H.; CARDWELL, S.C.; ANGUISH, T.; LEE, M.; KOCH, M. (1984). Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester: *Methanotrix* sp. as important acetoclastic methanogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.47, p.796-807 *apud* VAZOLLER, R.F. (1995). Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos, 259p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.

era introduzido no meio através de borbulhamento durante 30 minutos. Mantendo-se o fluxo de nitrogênio no meio de cultivo, distribuíam-se volumes padronizados desse meio de cultura para cada experimento, sendo 45 mL nos frascos dos ensaios de enriquecimento e 8,5 mL nos tubos do ensaio de isolamento. Esses frascos e tubos também eram mantidos durante a distribuição desse meio, sob fluxo de 100% N₂, através do sistema de distribuição simultânea de gases. Após a introdução do meio Zinder nos frascos e tubos, adicionava-se a solução de PCP e, posteriormente, os frascos de soro e de volumes maiores, eram fechados com rolhas de borracha de butila e lacres de alumínio, e os tubos Bellco® com rolhas de borracha de butila e tampas de rosca de plástico perfuradas centralmente. Os frascos e tubos eram esterilizados por autoclavagem a 120°C por 20 minutos e 15 psi. Após a esterilização dos meios a atmosfera era trocada, como indicado no item 4.2.1 desse capítulo, e mantinha-se a atmosfera de 70% de N₂ e 30% de CO₂, antes das demais soluções e inoculação.

A solução traço de metais descrita na Tabela 10, que faz parte da composição do meio Zinder, foi preparada adicionando-se primeiramente o NTA à água destilada e deionizada, seguido pelos outros componentes. O pH era ajustado para 7,0, com uma solução 10 M de KOH, a solução era distribuída em frascos de soro. A manutenção da solução de metais era feita sob refrigeração (4°C) após esterilização dos frascos fechados com borracha de butila e tampas de rosca, por autoclavagem por 20 minutos, a 120°C e 15 psi.

A indicação do potencial de oxi-redução do meio de cultivo foi feita através da solução de resazurina 0,1%. Esta solução foi preparada pesando-se 0,1 g do corante resazurina e diluindo-a em 100 mL de água. A solução indicadora era mantida sob refrigeração em frasco âmbar.

TABELA 10 - Composição da solução traço de metais - meio Zinder

Componentes	Quantidades - q.s.p. 1.000 mL de água destilada
NTA	4,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,556 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,086 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,17 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,21 g
H ₃ BO ₃	0,19 g
NiCl ₂	0,02 g
Na ₂ MoO ₄	0,01 g

Fonte: ZINDER *et al*¹ apud VAZOLLER, 1995

O meio Zinder foi acrescido de soluções estoque após a autoclavação, em alíquotas determinadas, segundo as concentrações dos compostos a serem testados no meio de cultivo. As soluções-estoque que fizeram parte do meio Zinder para cultivo foram denominadas soluções tampão de bicarbonato de sódio a 10%, vitaminas, redutora, fontes de ácidos (acético, propiônico e butírico), glicose (usada no primeiro ensaio) e sulfato de sódio (usado no terceiro ensaio). As concentrações das soluções-estoque e os volumes adicionados, apresentados na Tabela 11, referem-se aos ensaios 1,2 e 3, ou ensaios de enriquecimento 1,2 e 3.

Tabela 11 - Concentração das soluções-estoque e volumes adicionados nos reatores

Reagentes	Ensaio ¹ de enriquecimento	Concentrações das soluções-estoque	Volumes ² adicionados ao meio Zinder	Concentrações finais no meio de cultivo
Bicarbonato de sódio	1,2 e 3	10%	0,5 mL	1g/L
Vitaminas*	1,2 e 3	-	0,5 mL	-
Glicose	1	10 g/L	0,5 g	0,1 g/L
Sulfato de sódio	3	700 mM	0,7 mL	9,8 mM
Solução redutora	1,2 e 3	-	0,25 mL	-
Acetato de sódio	1,2 e 3	2M	0,5 mL	20 mM
Propionato de sódio	1,2 e 3	1M	0,5 mL	10mM
Butirato de sódio	1,2 e 3	1M	0,5 mL	10mM

¹ indicação dos ensaios em que foram empregadas. ² volumes de 50 mL totais

*concentração dos componentes da solução de vitaminas indicadas na Tabela 13

¹ZINDER, S.H.; CARDWELL, S.C.; ANGUISH, T.; LEE, M.; KOCH, M. (1984). Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester: *Methanotrix* sp. as important acetoclastic methanogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.47, p.796-807 apud VAZOLLER, R.F. (1995). Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbico de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos, 259p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.

No quarto ensaio (diluição decimal seriada), as concentrações das soluções-estoque e os respectivos volumes adicionados são mostrados na Tabela 12.

A solução de bicarbonato de sódio a 10% era preparada pesando-se o volume do sal e dissolvendo-o em água destilada. Após completa dissolução do sal, alíquotas de 15 mL eram distribuídas em frascos de antibiótico de 20 mL, sob fluxo de 100% nitrogênio. Os frascos fechados com batoques de borracha de butila e lacres de alumínio eram esterilizados por autoclavação, por 20 minutos, a 120°C e 15 psi. Após esterilização, os frascos eram mantidos à temperatura ambiente, na ausência de luz.

A solução de vitaminas era preparada adicionando-se as quantidades indicadas de soluções-estoque como indicado na Tabela 13, em um volume igual a 1.000 mL de água destilada (q.s.p). Após a completa dissolução das vitaminas, a solução era submetida a esterilização por filtração em sistema Millipore, com filtros de 0,22 μ m de porosidade, sob condições de assepsia. A solução era distribuída sob fluxo estéril de 100 % nitrogênio, em volumes de 15 mL em frascos de antibiótico de 20 mL, previamente esterilizados. Os frascos eram então fechados com batoques estéreis de borracha de butila, e lacrados com selo de alumínio. A solução de vitaminas era estocada sob refrigeração (4°C).

Tabela 12 - Concentração das soluções-estoque e volumes adicionados nos tubos Bellco®

Reagentes	Concentração das soluções-estoque	Volumes ¹ adicionados ao meio Zinder	Concentrações finais no meio de cultivo
Bicarbonato de sódio	10%	0,1 mL	1g/L
Vitaminas*	-	0,1 mL	-
Extrato de levedura	2%	0,1 mL	0,2g/L
Solução redutora	-	0,05 mL	-
Acetato de sódio	2M	0,05 mL	10mM
Propionato de sódio	1M	0,05 mL	10mM
Butirato de sódio	1M	0,05 mL	10mM

¹ volumes de 10 mL

* concentração dos componentes da solução de vitaminas indicadas na Tabela 13

A redução do meio Zinder foi feita pela adição de solução redutora de sulfato de sódio, previamente preparada e mantida em estoque. No preparo desta solução,

5,0 g de sulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$), eram dissolvidas em 100 mL de água destilada. A solução era distribuída rapidamente em frascos de antibiótico de 20 mL, sob fluxo de 100% nitrogênio. A esterilização da solução foi feita por autoclavação ou filtração rápida em membrana de 0,45 μm pelo sistema Millipore, sob condições de assepsia. A solução redutora estéril era mantida no escuro e à temperatura ambiente.

TABELA 13 - Composição da solução de vitaminas.

Componentes	Quantidades - q.s.p. 1.000 mL de água destilada
biotina	0,002 g
ácido fólico	0,002 g
tiamina.HCl	0,005 g
riboflavina	0,005 g
ácido nicotínico	0,005 g
pantotenato de cálcio	0,005 g
priridoxina.HCl	0,010 g
vitamina B ₁₂	0,0001 g
ácido lipóico	0,005 g

Fonte: adaptado de TOUZEL e ALBAGNAC¹ *apud* VAZOLLER, 1995

4.3.2.1 - Preparação das soluções-estoque de ácidos orgânicos voláteis

As soluções-estoque de ácidos orgânicos usadas nos meios de cultivo (Tabelas 11 e 12) foram preparadas à partir dos sais acetato de sódio, propionato de sódio e butirato de sódio, todos da marca Aldrich. Os sais foram dissolvidos em água destilada ou Milli-Q e mantidos sob fluxo de 100% N_2 durante mais ou menos 20 minutos e, após esse período, 15 mL das soluções de cada ácido eram distribuídas em frascos de antibiótico de 20 mL, sob o mesmo fluxo gasoso, e eram lacrados e autoclavados por 20 minutos, a 120°C e 15 psi.

¹TOUZEL, J.P.; ALBAGNAC, G. (1983). Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiology Letters*, v.16, p.241-245 *apud* VAZOLLER, R.F. (1995). Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos, 259p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.

4.3.2.2 - Preparação da solução-estoque de pentaclorofenol

O etanol foi escolhido como solvente para o composto pentaclorofenol, sendo a concentração de etanol usada para essa diluição de 34,25 mmol/L. As quantidades da solução de PCP introduzidas nos frascos e tubos foram padronizadas para se obter uma certa concentração final desejada no meio de cultivo. Essa solução foi adicionada ao meio de cultivo antes do processo de autoclavação.

A solução-estoque de PCP foi preparada com concentração de 1,28 g/L, e usada durante todo o trabalho experimental. A concentração de PCP estudada foi a de 2,5 mg/L no meio de cultura. Para isso foram colocados nos frascos volumes de 0,10 mL de solução-estoque de PCP em meio de cultivo de 50 mL (ensaios 1,2 e 3). Para o quarto ensaio, as quantidades de meio de cultivo foi 10 mL e o volume de solução de PCP adicionado foi 0,02 mL.

4.3.3 - Procedimentos de enriquecimento das culturas bacterianas.

A técnica do primeiro ensaio de enriquecimento consistiu no emprego do meio Zinder, acrescido das fontes de carbono e demais soluções (Tabela 11) e o lodo foi armazenado sob refrigeração, durante um período de 19 dias. Subseqüentemente, o segundo e terceiro ensaios foram inoculados com lodo mantido sob refrigeração durante 62 e 99 dias, respectivamente, sob condições culturais semelhantes.

Nos três ensaios, volumes de 45 mL de meio de cultura foram distribuídos em frascos de 250 mL, e após autoclavação, foram adicionadas soluções de bicarbonato de sódio, vitaminas, fontes de carbono e solução redutora, retiradas das soluções-estoque (Tabela 11). O volume de lodo inoculado foi de 5 mL (10% v/v). O lodo foi acrescido ao meio de cultura com o auxílio de uma pipeta invertida (item 4.2.5 desse capítulo), pois não foi possível a inoculação com seringa e agulha (lodo granulado), mesmo que de maior calibre. Assim, foi necessário abrir os frascos reatores (retirada

das tampas), sob o fluxo de 70% N₂ e 30% CO₂, antes de cada inoculação. Cabe salientar que as quantidades das soluções-estoque adicionadas aos 45 mL de meio Zinder não foram incluídas no cálculo do volume total de meio de cultura o qual foi de 50 mL (45 mL de meio Zinder + 5 mL de inóculo). Dessa maneira, o volume total de meio de cultura ultrapassou os 50 mL, devido às quantidades de soluções-estoque adicionadas (Tabela 11).

Os procedimentos empregados nos ensaios de enriquecimento foram bastante semelhantes. As diferenças estão apresentadas na Tabela 8.

Os períodos de incubação para os ensaios de enriquecimento foram, respectivamente, 18, 7 e 19 dias. O critério para a duração dos ensaios foi o cessamento da produção de metano após as trocas das tampas de borracha de butila e da 2^o alimentação (procedimentos necessários ao primeiro ensaio devido ao vazamento de gás apresentado pelas tampas de borracha de butila), para o ensaio 1; para os ensaios 2 e 3 o término ocorreu após ter sido alcançado o objetivo proposto nesses ensaios.

Nos ensaios de enriquecimento, os frascos reatores foram preparados em duplicata, as temperaturas de incubação foram mantidas na faixa de 55±2°C e agitação de 175 rpm. Os ensaios receberam monitoramento em relação a produção de metano e degradação de PCP, sendo as análises cromatográficas de metano feitas diariamente numa frequência de duas vezes ao dia e as análises cromatográficas do PCP foram feitas no final de cada ensaio. Exames microscópicos foram realizados somente para o terceiro ensaio, pois, dentro do propósito de cada ensaio, os ensaios 1 e 2 foram realizados apenas para a verificação do potencial de degradação do lodo.

4.3.3.1 - Procedimentos de isolamento e identificação das culturas de bactérias metanogênicas e não metanogênicas

O ensaio para o isolamento das culturas bacterianas foi realizado incubando-se tubos Bellco® em uma estufa bacteriológica, sem agitação, à temperatura de 55±2°C.

O procedimento adotado para a obtenção de culturas de bactérias metanogênicas e não metanogênicas, a partir dos ensaios de enriquecimento, foi o da diluição decimal seriada. O meio mineral usado foi o de Zinder, em volumes de 9 mL, acrescidos das soluções complementares de bicarbonato de sódio a 10%, vitaminas, fontes de carbono (ácidos acético/propiónico e butírico), solução redutora e solução de extrato de levedura a 2%, retiradas das soluções-estoque (Tabela 12). As inoculações foram feitas após a completa redução do meio de cultura, indicada pela mudança de coloração da solução de resazurina, de rosa para incolor. Os inóculos (1% v/v), usados nesse ensaio de isolamento foram provenientes do terceiro ensaio de enriquecimento, a partir de frascos que apresentavam melhor porcentagem de produção de metano e turbidez visual acentuada do tubos Bellco®. As inoculações eram feitas em duplicatas. Seringas de insulina estéreis foram utilizadas para as adições de soluções e inóculos ao meio de cultura. A homogeneização dos tubos Bellco® era feita manualmente numa frequência de duas vezes ao dia.

Foram feitas duas baterias de tubos, uma contendo ácidos orgânicos voláteis (AOV) acrescido das outras soluções-estoque, tubos controles, e outra bateria contendo ácidos orgânicos voláteis com soluções-estoque e solução de pentaclorofenol (PCP).

Antes de ser feito o primeiro sub-cultivo das duas baterias de tubos, a faixa das diluições era de 10^{-1} a 10^{-7} . Através dos resultados de crescimento das culturas bacterianas pelas técnicas de microscopia e cromatografia gasosa, observou-se que as mais baixas diluições, cujos resultados foram positivos, ou seja, apresentaram turbidez visual no meio de cultura, foram subcultivadas em um novo meio numa faixa de diluição de 10^{-1} a 10^{-3} . A partir desse primeiro sub-cultivo, outros subsequentes foram realizados, até serem obtidas as culturas bacterianas desejadas que estariam relacionadas de algum modo com o processo de degradação do PCP.

4.4 - Procedimentos para as análises cromatográficas

4.4.1 - Metodologia para avaliação dos gases produzidos

Os gases formados através do metabolismo bacteriano foram analisados por cromatografia à gás. Amostras de gás eram retiradas rotineiramente. Utilizando-se uma seringa especial, com trava da Hamilton Gastight, eram retirados 5 mL de amostra da atmosfera dos frascos ou tubos Bellco®. Agulhas estéreis, previamente autoclavadas, eram usadas para que houvesse total assepsia. Para cada frasco ou tubo era feita a troca de agulha. As tampas dos frascos eram embebidas em álcool e flambadas antes da retirada das amostras de gás.

A produção de metano foi expressa em mmoles/L. Para expressá-lo dessa maneira, foi necessário preparar uma curva de calibração através do uso de um padrão de metano $97\pm 1\%$, e diferentes volumes foram injetados no cromatógrafo. Traçou-se a curva de calibração utilizando-se os pontos da área medida pelo cromatógrafo e o volume injetado expresso em mmoles. Foram feitas correções para a CNTP. A curva de calibração é apresentada no Anexo 2.

Nas análises por cromatografia gasosa foi utilizada, como fase móvel, uma solução de ácido sulfúrico 6,5 mM, preparada com água MiliQ e filtrada em sistema Millipore com filtro de 0,22 μm de porosidade, para retirada de bolhas.

No presente trabalho, a produção de metano ao longo dos ensaios permitiu calcular a atividade metanogênica (AM) e a atividade metanogênica específica (AME). Através da equação da curva de calibração de metano foram obtidos valores de metano em μmoles contidos em 0,5 mL de amostra coletada nos frascos. Para o cálculo da AM e AME foi necessário a obtenção de valores de produção de metano em mmoles/L. A seguir, apresenta-se o roteiro usado para se chegar a esses valores segundo ARAÚJO (1995).

(1) Acumulam-se os valores de metano (em mmoles/L) da seguinte forma:

- No tempo 0, a concentração de metano será aquela obtida no “headspace” do frasco nesse tempo.
- No tempo 1, a concentração de metano será aquela obtida no “headspace” do frasco nesse tempo, mais a concentração de metano que foi “jogada fora no tempo anterior (zero)”, ou seja, é a concentração de metano amostrada no tempo zero (no volume de 0,5 mL).
- No tempo 2, a concentração de metano será aquela obtida no headspace do frasco, nesse tempo; mais a concentração de metano amostrada no tempo zero, e mais a concentração de metano no tempo 1. E, assim sucessivamente até o último tempo.

(2) Plotam-se os valores de produção de metano em função do tempo, num gráfico; faz-se a escolha dos pontos (no mínimo quatro) que correspondem à fase de maior produção de metano (reta com maior inclinação), através de uma regressão linear simples acha-se o coeficiente angular dessa reta. Este coeficiente angular representa a AM; se dividirmos este valor pela concentração de biomassa (gramas de SSV/L de um determinado frasco, por exemplo), obter-se-á a AME.

4.4.2 - Análises cromatográficas para a avaliação do potencial de degradação do composto pentaclorofenol

A degradação do composto pentaclorofenol pela atividade bacteriana e o surgimento de possíveis intermediários desse processo de degradação, foi constatada através da cromatografia gasosa. Através desse tipo de teste foi possível constatar se houve ou não degradação, em que porcentagem e quais os possíveis compostos intermediários produzidos.

A análise cromatográfica para o organoclorado era realizada no final do período de incubação de cada ensaio, para os ensaios de enriquecimento. Para o ensaio de isolamento, a análise cromatográfica era feita sempre antes de se fazer o sub-cultivo dos tubos Bellco®.

As análises eram realizadas com 6 mL de amostra retirada dos frascos de enriquecimento. Para os tubos Bellco® era possível a retirada de uma pequena quantidade de amostra de cada tubo, visto que o volume total em cada tubo era de 10 mL, e também havia a necessidade de retirada de amostras para análises microscópicas rotineiras das diluições. Variando de acordo com a disponibilidade de cada tubo, retirava-se de 3 a 4 mL de amostra para esse tipo de teste. Essas amostras eram posteriormente submetidas à metodologia específica desenvolvida por DAMIANOVIC (1997) no Laboratório de Processos Anaeróbios do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos - USP.

As curvas de calibração para o PCP, TCP e DCP foram preparadas e são mostradas no Anexo 2. Um cromatograma típico também é mostrado no Anexo 2.

À seguir será descrita a metodologia para a determinação quantitativa de clorofenóis por cromatografia gasosa:

1 - Obtenção da amostra:

Tomou-se 5mL do sobrenadante do reator. Amostras com elevadas concentrações de sólidos eram centrifugadas.

2 - Correção do pH:

O pH das amostras era ajustado para 2 com a adição de ácido sulfúrico.

3 - Extração do PCP:

Adicionou-se-se à amostra 5 mL de hexano por 3 vezes, agitando por 1 min. para cada adição. As 3 alíquotas foram adicionadas e evaporadas até o volume inicial da amostra (5mL). Esta evaporação era feita na capela à temperatura ambiente.

4 - Derivatização da amostra:

A amostra foi derivatizada pela adição de 1mL de diazometano, cuja função é promover a esterificação dos clorofenóis, facilitando sua separação e detenção. Aguardou-se até que o volume da amostra retornasse a 1mL. A evaporação foi feita na capela, à temperatura ambiente.

5 - Injeção da amostra:

Injetou-se 1 mL da amostra na fase orgânica derivatizada.

Para determinação exclusiva do PCP, a temperatura inicial foi de 220°C e a final de 250°C com rampa de 5°C/min.

Para a determinação qualitativa do PCP e metabólitos a temperatura inicial foi de 80°C e a temperatura final de 220°C com rampa de 3°C/min.

4.5 - Procedimentos para as análises microscópicas

No início do trabalho, foram feitos exames microscópicos do lodo bruto recém coletado da Usina São Martinho. O lodo granulado anaeróbio foi coletado do biodigestor através de uma torneira que ficava no fundo do mesmo, para a coleta foi usado um recipiente plástico de 500 mL. No dia seguinte à coleta do lodo, no Laboratório de Processos Anaeróbios do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos - USP, usando os procedimentos de preparação da amostra, fez-se a preparação da amostra para observação ao microscópio. Utilizando uma proveta de 100 mL, foram vertidos 30 mL de amostra de lodo e completou-se o restante com água destilada. Feita a homogeneização, esperou-se até que o lodo decantasse e, após a decantação o sobrenadante foi desprezado. Com o auxílio de uma pipeta de 10 mL invertida, era coletada uma alíquota de 5 mL de amostra de lodo. Dessa alíquota uma pequena porção era

colocada entre lâmina e lamínula e observada sob microscopia óptica de luz comum, por contraste de fase e por fluorescência.

As amostras de lodo dos três primeiros ensaios (enriquecimento) eram coletadas diretamente dos frascos com seringas de insulina e agulhas estéreis de maior calibre (40x12) e analisadas da mesma maneira como observado para o lodo bruto. A quantidade de amostras retiradas eram aleatórias, visto que as observações microscópicas eram feitas sempre no final do tempo de incubação de cada ensaio. Microscopia de varredura de alta resolução não foi realizada para as amostras dos ensaios de enriquecimento.

Para os ensaios de isolamento a quantidade de amostra a ser analisada era de 0,5 mL retiradas diretamente dos tubos com seringas de insulina e agulhas grossas estéreis previamente lavadas com nitrogênio gasoso. Uma gota da amostra era colocada diretamente entre lâmina e lamínula e as amostras de cada tubo eram observadas através de microscopia de luz comum, contraste de fase e fluorescência. A microscopia de varredura foi realizada para essas amostras, seguindo técnicas desenvolvidas por ARAÚJO *et al* (1998), no Laboratório de Processos anaeróbios da Escola de Engenharia de São Carlos - USP. Esse tipo de microscopia é realizada no Instituto de Física da Escola de Engenharia de São Carlos (USP), microscópio da marca Zeiss DSM-960.

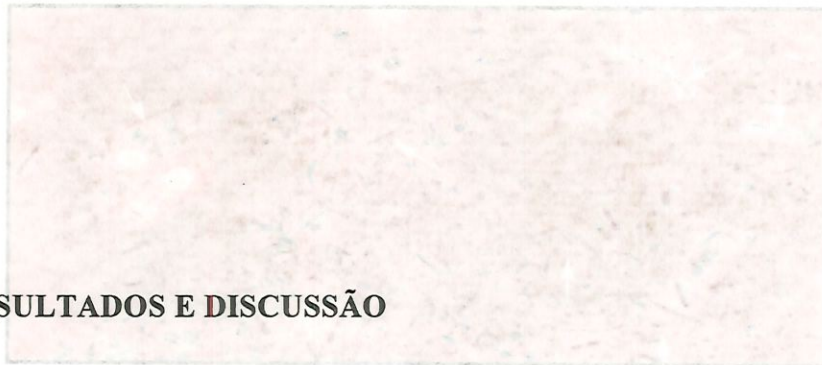
Para que a amostra de lodo pudesse ser observada com maior precisão através da microscopia de luz comum, contraste de fase e fluorescência, isto é, para que as bactérias pudessem ser analisadas imobilizadas, foi utilizada uma técnica de preparação de lâminas em que uma solução 2% de ágar liqüefeito era disposto na superfície da lâmina com o auxílio de uma pipeta de 5 mL, e quando esse ágar se solidificasse, a amostra de lodo era então colocada nessa superfície gelatinosa e coberta com uma lamínula. Essa técnica, descrita pela DSM (1991), possibilitava que o excesso de água da amostra fosse absorvida pelo ágar, otimizando a qualidade da observação e foi usada tanto para os ensaios de enriquecimento como para os de isolamento.

A microscopia de fluorescência foi bastante útil na indicação de bactérias metanogênicas, pois essas células em boas condições de crescimento fluorescem com cor azul esverdeada devido a presença nesses tipos celulares de coenzimas específicas a F_{420} e F_{350} , que fluorescem a certos comprimentos de onda de 420 e 350 nm. As análises sob esse tipo de microscopia eram feitas rapidamente, colocando-se a amostra de lodo diretamente sobre a lâmina e cobrindo com lamínula (DODDEMA & VOGELS, 1978).

Foram realizadas fotomicrografias eletrônicas das amostras sob microscopia de luz comum, contraste de fase, fluorescência (1º, 2º, 3º e 4º ensaios) e varredura de alta resolução (4º ensaio).

Foram feitas colorações de Gram com as amostras do quarto ensaio. As lâminas coradas, foram observadas sob microscopia de luz comum. Tanto a microscopia de varredura quanto a coloração de Gram, que são testes complementares nesse trabalho, serviram para se obter dados mais precisos à respeito dos tipos morfológicos que puderam ser encontrados no ensaio de isolamento.

As observações microscópicas com luz comum, contraste de fase, fluorescência foram feitas usando-se um microscópio da marca Olympus BHT2 e realizadas no Laboratório de Microbiologia da Escola de Engenharia de São Carlos no Departamento de Hidráulica e Saneamento-USP. Essas análises microscópicas foram feitas com o seguinte aumento: ocular 10, objetiva 100 e zoom de 1,25, e no caso da microscopia de fluorescência usou-se luz ultravioleta.



5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Características do lodo granulado

O lodo oriundo do reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente, UASB, operado sob condições termofílicas com a vinhaça do processo de destilação para produção de etanol (gerado pela fermentação do açúcar de cana), apresentou concentrações iniciais de sólidos suspensos voláteis (SSV) da ordem de 23 g/L. O lodo termófilo era granulado, sendo que os grânulos eram inferiores a 1 mm em tamanho. Cabe salientar que o lodo foi coletado durante o período de entre-safra da produção de álcool da região de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, e o biorreator recebia alimentação (vinhaça) com baixa concentração de matéria orgânica, segundo comunicação pessoal na Usina¹.

A Figura 6 mostra os tipos morfológicos presentes durante os exames microscópicos do lodo termófilo após a coleta no biorreator. Os tipos morfológicos presentes no lodo foram bacilos de diversos tamanhos. Não foram verificadas morfologias bacterianas de sarcinas ou mesmo bacilos fluorescentes em quantidade, o que poderia ser relacionado a uma baixa atividade metanogênica do lodo. Segundo comunicação pessoal da Usina¹, o biorreator industrial estava ainda em fase de formação de lodo biológico, apesar do conteúdo adequado de SSV de 23 g/L. O biorreator que trata vinhaça operava com cargas orgânicas inferiores, e alimentação estocada¹, como é usual nos períodos de entressafra. A amostra de lodo obtida foi, então, diretamente submetida ao enriquecimento com PCP.

¹Comunicação pessoal do Engenheiro Marcos Eduardo de Souza, Usina São Martinho

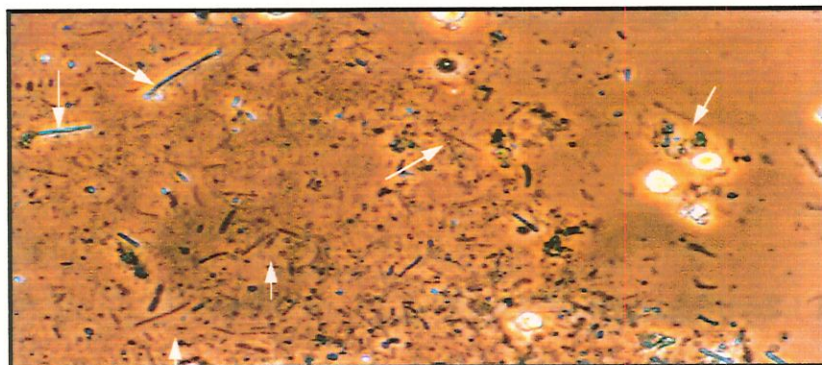


FIGURA 6 - Fotomicrografia da amostra do lodo anaeróbico termófilo coletado diretamente do biorreator. Pode-se observar células em formatos de bacilos (setas brancas) e cocos dispersos. Exame microscópico sob contraste de fase (objetiva 100, ocular 10 e zoom 1,25)

Em 1995, VAZOLLER observou no período de entressafra agrícola, que o lodo granulado de um biorreator UASB piloto de 75m³, da mesma Usina, operado sob condições próximas ao do biorreator em escala industrial, e com conteúdo de SSV da ordem de 20g/L, apresentava grânulos de aproximadamente 2 a 3 mm e presença significativa de sarcinas e bacilos fluorescentes, indicação indireta de atividade metanogênica do lodo, bem como bacilos não fluorescentes de diferentes tamanhos. Comparados os resultados do exame microscópico de ambos os lodos, obtidos nos dois sistemas, piloto e industrial, em períodos de entressafra, observa-se que a microbiota do sistema em escala industrial foi bastante diferente.

Nos trabalhos citados, apenas o de WU et al. (1993) referiu-se a morfologias celulares presentes no lodo granulado já adaptado ao PCP, e que constituía o inóculo de sistemas UASB para degradação de PCP, salientando os tipos metanogênicos filamentosos (*Methanothrix* sp), bacilos (*Methanobacterium* sp) e sarcinas (*Methanosarcina* sp). O lodo termófilo estudado nesse trabalho não indicou inicialmente uma morfologia metanogênica predominante, mas observando-se a Figura 6, as formas refringentes poderiam ser sarcinas; porém, não houve confirmação de fluorescência emitida no exame das células, sob luz ultra-violeta.

5.2 - Enriquecimento das culturas bacterianas em substratos orgânicos

5.2.1 - Etapa de enriquecimento

Dentro dos objetivos do trabalho, realizou-se ao longo de todo o trabalho experimental quatro ensaios, três ensaios de enriquecimento, nos quais foram testados diversos substratos orgânicos e suas concomitantes potencialidades como doadores de elétrons para a desalogenação do composto organoclorado, e um ensaio de isolamento, o qual foi realizado empregando-se os substratos que apresentaram um melhor resultado na porcentagem de remoção do PCP nos ensaios de enriquecimento.

Os ensaios de enriquecimento das culturas bacterianas foram realizados com a finalidade de se avaliar o potencial do lodo anaeróbio termófilo na degradação do composto PCP. A fim de facilitar a apresentação dos resultados obtidos nessa etapa do trabalho, observa-se na Tabela 14, resumidamente, as condições empregadas nos ensaios de enriquecimento 1,2 e 3.

Os procedimentos adotados nos três ensaios para o enriquecimento do lodo em PCP foram semelhantes em relação à temperatura de incubação, agitação e manutenção de anaerobiose. Muito embora os lodos tenham sido submetidos a apenas uma alimentação, nas condições indicadas na Tabela 14 para cada ensaio, considerou-se o cultivo como enriquecimento bacteriano de “primeira geração” em meio específico. HOLLIGER et al. (1988) sugeriram essa denominação para enriquecimentos iniciais de lodos anaeróbios (sedimentos naturais e grânulos de biodigestores) em clorobenzenos, sob condições próximas as empregadas nos trabalhos experimentais dessa Dissertação. Não foram verificados distúrbios nos sistemas de reação durante os ensaios, tais como alteração da coloração do indicador de potencial de oxi-redução (resazurina) e variações de temperatura e agitação.

TABELA 14 - Condições dos ensaios de enriquecimento

Ensaio s	Substratos testados	Reatores	Duração do Ensaio(dias)	Tempo de estoque do inóculo sob refrigeração(dias)
1	ácidos orgânicos voláteis (AOV)	RAOV1/RAOV2	18	19
	ácidos orgânicos voláteis (AOV) + PCP ¹	RAOVP3/RAOVP4	18	19
	glicose	RG5/RG6	18	19
	glicose+PCP	RGP7/RGP8	18	19
	PCP	RP9/RP10	18	19
2	ácidos orgânicos voláteis (AOV) + PCP	RAOVP1/RAOVP2	7	62
	ácidos orgânicos voláteis (AOV)	RAOV3/RAOV4	7	62
	PCP	RP5/RP6	7	62
3	ácidos orgânicos voláteis (AOV) + PCP	RAOVP1/RAOVP2	19	99
	ácidos orgânicos voláteis (AOV)	RAOV3	19	99
	ácidos orgânicos voláteis (AOV) + sulfato	RAOVSO ₄ ²⁻⁴	19	99

¹PCP - pentaclorofenol; temperatura: 55±2°C e 175 rpm de agitação

O inóculo para cada ensaio foi proveniente de estoques de lodos armazenados sob refrigeração, a 7°C, como mostrado na Tabela 14. A manutenção do lodo anaeróbio termófilo sob refrigeração não afetou a resposta da atividade celular nos três ensaios de enriquecimento, em relação a produção inicial de metano. Como pode ser observado nas Figuras 7 e 8 (réplicas), as quais mostram a produção do gás metano nos sistemas de reação contendo apenas AOV (fontes orgânicas usuais para o desenvolvimento do lodo em estudo). A produção de metano nessas condições iniciava-se em tempos de incubação inferiores a 25h.

Dessa maneira, a produção iniciava sem que houvesse uma fase de adaptação anterior. Comparando-se os resultados com aqueles obtidos por LARIZATTI (1997), que estudou o comportamento de um lodo mesofílico (35°C) na degradação do PCP (aproximadamente 5 mg PCP/g SSV), utilizando-se os mesmos substratos orgânicos do presente trabalho, verifica-se que o lodo termófilo não necessitou de tempos de incubação tão longos como o lodo mesófilo (20 dias) para iniciar a produção de metano. No entanto, a quantidade de PCP estudada sob condições mesofílicas foi

superior à estudada nessa Dissertação, o que poderia justificar os longos tempos necessários para a resposta do lodo, mesmo que previamente adaptado a concentrações de PCP de 10 mg/L, como indicado no trabalho de LARIZZATTI (1997). Além disso, o lodo mesófilo era floculento, diferente do consórcio granuloso termófilo estudado, o que em geral, favorece as interações microbianas anaeróbias na degradação de um determinado composto.

De acordo com revisão de VAZOLLER (1994) e considerando genérica a comparação dos trabalhos com PCP acima referidos, a distinção das espécies mesófilas e termófilas reside, entre outros fatores, nas diferentes velocidades de crescimento que apresentam frente ao mesmo substrato. Os termófilos metanogênicos podem crescer duas a quatro vezes mais rapidamente que os seus homólogos mesófilos. O lodo termófilo estudado não necessitou de tempos de resposta longos, na presença de 2,5 mg PCP/L.

BANERJI e BAJPAI (1994) reforçaram em seus estudos a importância do uso de uma cultura mista aclimatada na degradação do PCP e concluíram que a remoção do PCP foi vagarosa em sistemas com uma concentração inicial de PCP maior do que os valores ao qual o lodo foi adaptado. Por outro lado, uma rápida remoção do PCP ocorreu quando a concentração inicial aplicada foi menor do que os valores usados para a adaptação do lodo. O inóculo usado no presente trabalho foi um lodo anaeróbio (consórcio misto) proveniente de um reator UASB operando com vinhaça, portanto sem prévia exposição ao PCP. Embora não houvesse prévia adaptação do lodo ao PCP, houve uma eficiente porcentagem de remoção do composto, chegando em algumas situações a aproximadamente 100%, como será visto adiante.

Alguns trabalhos realizados sobre consórcios microbianos anaeróbios e sua ação na degradação de PCP, particularmente de lodos granulados oriundos de biorreatores do tipo UASB (HENDRIKSEN et al., 1992; NICHOLSON et al., 1992; MOHN & KENNEDY, 1992; WU et al., 1993), mostraram que na presença de fontes orgânicas, tais como AOV e glicose, as bactérias anaeróbias foram hábeis em desalogenar o PCP. As células bacterianas eram adaptadas ou não previamente ao composto halogenado sob temperatura mesófila ou termófila. Os resultados de

LARSEN et al. (1991), a temperatura de 50°C revelaram atividade degradadora de PCP por lodos anaeróbios de sedimentos naturais e de esgotos. Na presente Dissertação, o lodo estudado foi considerado não adaptado.

Os ensaios de enriquecimento foram monitorados em relação a produção de metano e remoção de PCP.

As Tabelas de 15 a 20; 23 a 27 e 30 a 32, e as Figuras de 7 a 12; 13 a 17 e 18 a 20 referem-se aos valores de produção de metano obtidos pela atividade das culturas anaeróbias nos três ensaios de enriquecimento. Os valores abaixo de cada Figura indicam as atividades metanogênica (AM) e metanogênica específica (AME) calculadas para os lodos termófilos nas diferentes condições. Os valores empregados para os cálculos de AM para cada ensaio de enriquecimento, mmoles de metano/L, e o respectivo tempo estão indicados nas Tabelas de 15 a 20; 23 a 27 e 30 a 32, e os valores de AME foram obtidos utilizando-se o conteúdo de SSV (g/L) em cada sistema de reação (2,3 g/L). Abaixo das Figuras encontram-se os valores esperados (teóricos) de metano, segundo as fontes adicionadas em cada ensaio. A forma de cálculo em relação a quantidade teórica de metano a ser produzida está indicada no Anexo 1. Os valores teóricos de metano obtidos para cada condição nos ensaios quando comparados com os valores máximos de metano produzido em cada condição esclarece que os valores se aproximaram visto que as porcentagens de conversão nos ensaios em relação aos valores teóricos calculados, foram: 60% na presença de ácidos orgânicos voláteis, 51% na presença de ácidos orgânicos voláteis e PCP, 36% na presença de etanol e 73% na presença de sulfato. Nas análises de AME em testes de batelada esses valores representam um bom resultado.

As Tabelas de 15 a 20 e Figuras de 7 a 12, referem-se aos resultados obtidos ao longo do ensaio 1, em relação à produção de metano. O Anexo 3 mostra as respectivas Tabelas contendo os cálculos feitos para transformar a área de metano obtida pelo cromatógrafo em mmoles/L. Salienta-se que a AM e a AME para o ensaio 1 foram calculadas no período anterior à troca de batoques de borracha de butila e lacres de alumínio e da única realimentação feita, onde foi mantido os mesmos valores de concentração de cada fonte orgânica, como referido no capítulo de Materiais e

Métodos (item 4.3.2). A AM e AME foram calculadas no período anterior à troca de batoques de borracha de butila devido aos problemas ocorridos com o primeiro ensaio em relação à produção de metano. Esse ensaio teve que ser paralisado, pois estava ocorrendo um vazamento de gás através das tampas. Dessa maneira, existiram duas fases ao longo do primeiro ensaio, uma fase antes da troca das tampas (201 horas) e outra após a troca das tampas (210 horas). Na tentativa de se sanar o problema com a troca das tampas, acabou-se por provocar uma paralisação na produção de metano em alguns frascos. Posteriormente, tentou-se fazer a realimentação de todos os frascos na intenção de “reanimar” novamente as culturas. Os resultados obtidos não foram satisfatórios, pois mais frascos acabaram tendo sua produção de metano interrompida. No entanto, essas medidas se fizeram necessárias, e após a verificação de que seus resultados não foram satisfatórios, paralisou-se o primeiro ensaio, sendo esse tempo desconsiderado (210 horas) como fazendo parte do tempo de incubação do primeiro ensaio.

TABELA 15 - Valores de metano obtidos durante o Ensaio 1 - RAOV1, primeiras 200 h de incubação, a $55 \pm 2^\circ\text{C}$

Tempo (h)	Cálculo final (mmoles/Lc)
0	0
10	1,955
37	4,722
65	7,641
84	8,757
91,5	9,596
108	10,180
115,5	10,495
159	9,429
179	6,538
188,5	7,299
201	6,522

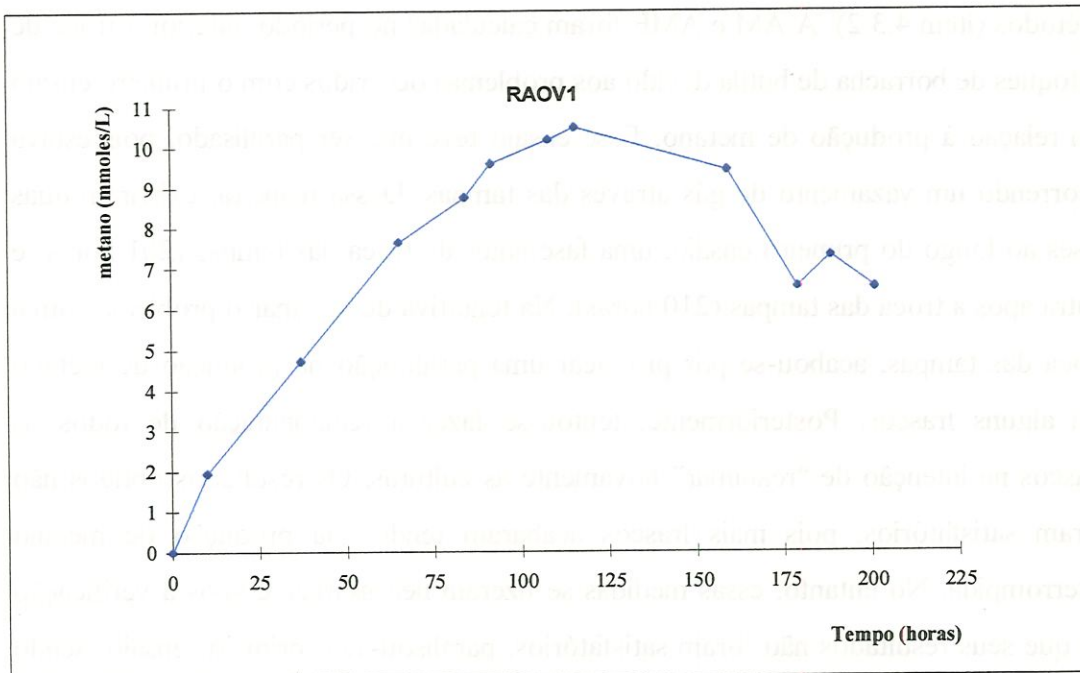


FIGURA 7 - Representação gráfica da curva de produção de metano (mmoles/L) - Ensaio 1

Intervalo de pontos escolhidos (tempo): 10-108h com exceção do ponto 84h

Equação da reta que representa a AM: $CH_4 = 0,0861x + 1,4552$ $r^2 = 0,9816$

Valor de AM: 0,0861 mmoles CH_4 /L.h

Valor de AME, considerando o valor de SSV = 2,3 g/L utilizado no ensaio: 0,0412 mmoles de CH_4 /g SSV.h

Valor máximo de metano produzido no sistema: 10,495 mmoles CH_4 /L

Valores teóricos de metano, se todas as fontes orgânicas (AOV) fossem diretamente transformadas em metano: AOV = 17,5 mmoles/L

TABELA 16 - Valores de metano obtidos durante o Ensaio 1 - RAOV2, primeiras 200 h de incubação, a $55 \pm 2^\circ C$

Tempo (h)	Cálculo final (mmoles/Lc)
0	0
10	1,955
37	3,541
84	4,558
91,5	5,269
108	5,750
115,5	6,741
159	6,315
179	4,644
188,5	4,310
201	3,089

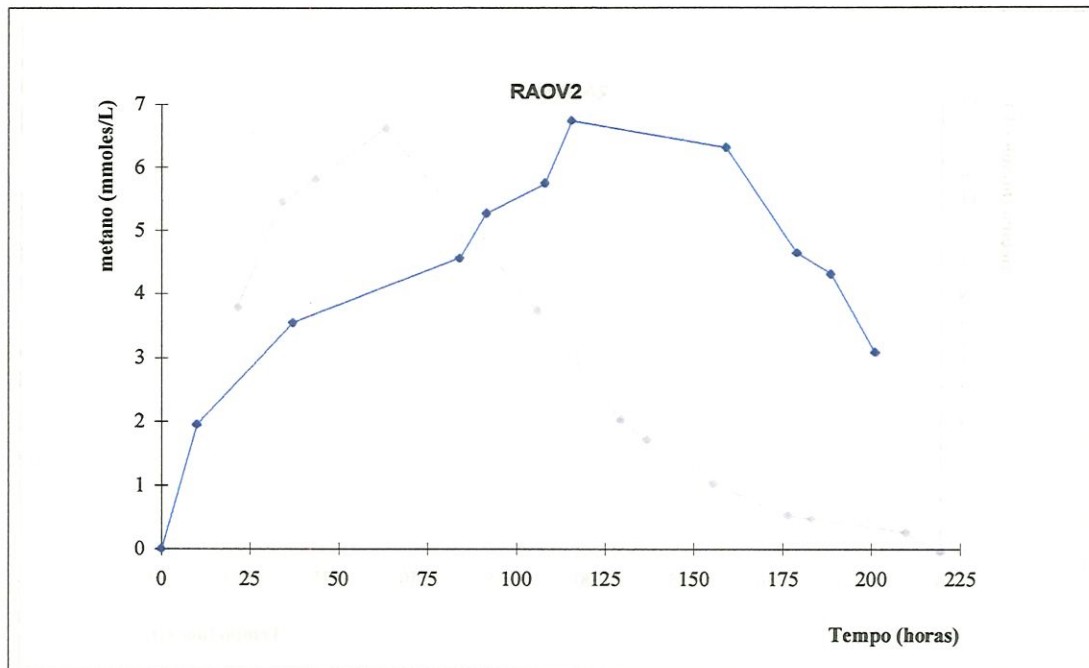


FIGURA 8 - Representação gráfica da curva de produção de metano (mmoles/L) - Ensaio 1

Intervalo de pontos escolhidos (tempo): 10 a 108h

Equação da reta que representa a AM: $CH_4 = 0,0374x + 1,8259$ $r^2 = 0,9796$

Valor de AM: 0,0374 mmoles $CH_4/L.h$

Valor de AME, considerando o valor de SSV = 2,3 g/L utilizado no ensaio: 0,0162 mmoles de CH_4/g SSV.h

Valor máximo de metano produzido no sistema: 6,741 mmoles CH_4/L

Valores teóricos de metano, se todas as fontes orgânicas (AOV) fossem diretamente transformadas em metano: AOV = 17,5 mmoles/L

TABELA 17 - Valores de metano obtidos durante o Ensaio 1 - RAOVP3, primeiras 200 h de incubação, a $55 \pm 2^\circ C$

Tempo (h)	Cálculo final (mmoles/Lc)
0	0
10	0,617
37	1,028
43,5	1,121
65	2,120
84	3,477
91,5	4,113
115,5	7,493
159	13,252
179	11,633
188,5	10,912
201	7,558

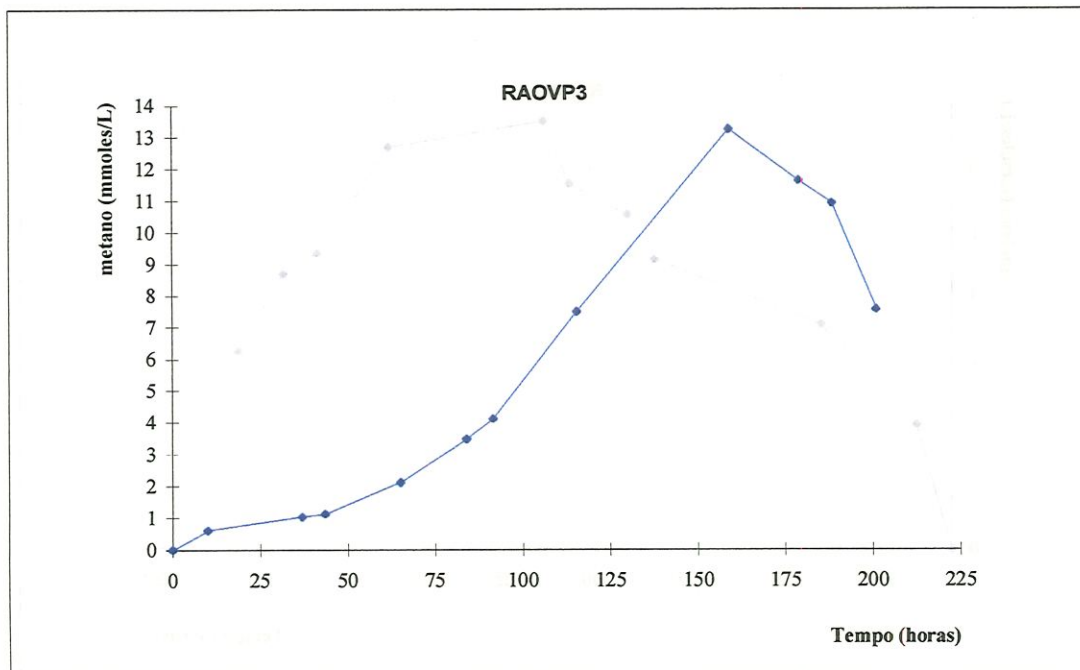


FIGURA 9 - Representação gráfica da curva de produção de metano (mmoles/L) - Ensaio 1

Intervalo de pontos escolhidos (tempo): 84 a 159h

Equação da reta que representa a AM: $CH_4 = 0,1323x - 7,8054$ $r^2 = 0,9989$

Valor de AM: 0,1323 mmoles $CH_4/L.h$

Valor de AME, considerando o valor de SSV = 2,3 g/L utilizado no ensaio: 0,05752 mmoles de CH_4/g SSV.h

Valor máximo de metano produzido no sistema: 13,252 mmoles CH_4/L

Valores teóricos de metano, se todas as fontes orgânicas (AOV+etanol) fossem diretamente transformadas em metano: AOV+etanol = 26 mmoles/L

TABELA 18 - Valores de metano obtidos durante o Ensaio 1 - RAOVP4, primeiras 200 h de incubação, a $55 \pm 2^\circ C$

Tempo (h)	Cálculo final (mmoles/Lc)
0	0
10	0,679
37	3,887
65	10,443
84	13,079
91,5	14,216
115,5	14,042
179	16,003
188,5	14,046
201	10,686

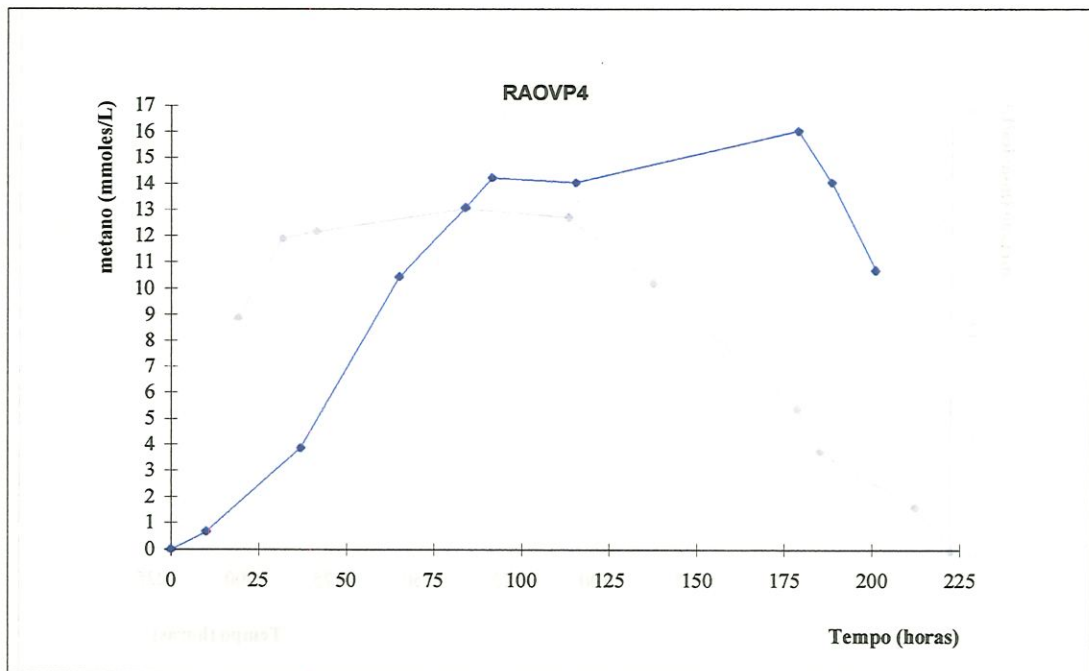


FIGURA 10 - Representação gráfica da curva de produção de metano (mmoles/L) - Ensaio 1

Intervalo de pontos escolhidos (tempo): 10-115,5 com exceção dos pontos 37h e 91,5h

Equação da reta que representa a AM: $\text{CH}_4 = 0,1329x + 0,4438$ $r^2 = 0,9262$

Valor de AM: 0,1329 mmoles $\text{CH}_4/\text{L.h}$

Valor de AME, considerando o valor de SSV = 2,3 g/L utilizado no ensaio: 0,0577 mmoles de $\text{CH}_4/\text{g SSV.h}$

Valor máximo de metano produzido no sistema: 16,003 mmoles CH_4/L

Valores teóricos de metano, se todas as fontes orgânicas (AOV+etanol) fossem diretamente transformadas em metano: AOV+etanol = 26 mmoles/L

TABELA 19 - Valores de metano obtidos durante o Ensaio 1 - RP9, primeiras 200 h de incubação, a $55 \pm 2^\circ\text{C}$

Tempo (h)	Cálculo final (mmoles/Lc)
0	0
10	0,392
37	0,890
43,5	1,275
84	2,404
108	2,989
137	3,064
179	2,852
188,5	2,787
201	2,080

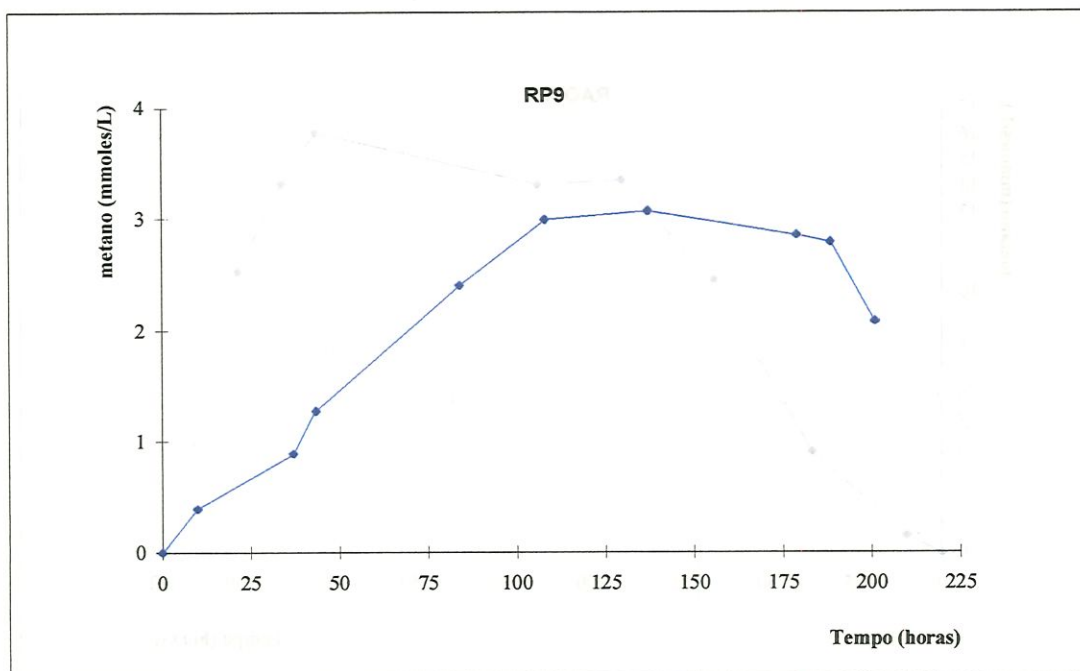


FIGURA 11 - Representação gráfica da curva de produção de metano (mmoles/L) - Ensaio 1

Intervalo de pontos escolhidos (tempo): 10 a 108h

Equação da reta que representa a AM: $CH_4 = 0,0267x + 0,1251$ $r^2 = 0,9995$

Valor de AM: 0,0267 mmoles $CH_4/L.h$

Valor de AME, considerando o valor de SSV = 2,3 g/L utilizado no ensaio: 0,0116 mmoles de CH_4/g SSV.h

Valor máximo de metano produzido no sistema: 3,064 mmoles CH_4/L

Valores teóricos de metano, se todas as fontes orgânicas (etanol) fossem diretamente transformadas em metano: etanol = 8,5 mmoles/L

TABELA 20 - Valores de metano obtidos durante o Ensaio 1 - RP10, primeiras 200 h de incubação, a $55 \pm 2^\circ C$

Tempo (h)	Cálculo final (mmoles/Lc)
0	0
10	0,319
37	0,821
43,5	1,140
91,5	3,776
137	4,347
179	4,712
188,5	4,530
201	3,944

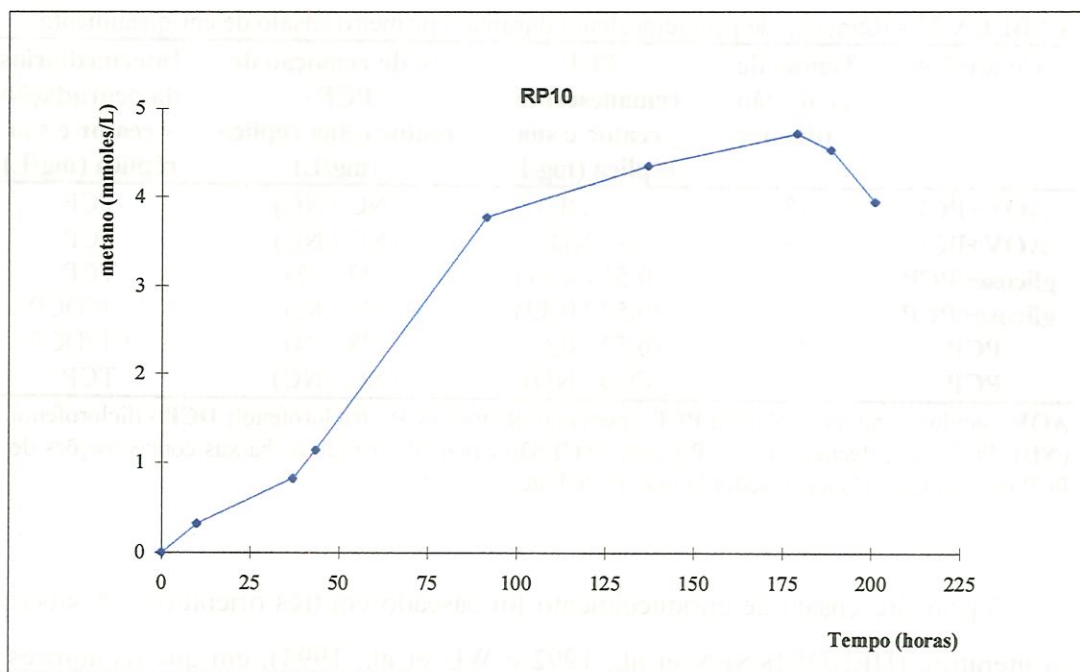


FIGURA 12 - Representação gráfica da curva de produção de metano (mmoles/L) - Ensaio 1

Intervalo de pontos escolhidos (tempo): 10 a 91,5h

Equação da reta que representa a AM: $\text{CH}_4 = 0,0408x - 0,1712$ $r^2 = 0,9663$

Valor de AM: 0,0408 mmoles $\text{CH}_4/\text{L.h}$

Valor de AME, considerando o valor de SSV = 2,3 g/L utilizado no ensaio: 0,0177 mmoles de $\text{CH}_4/\text{g SSV.h}$

Valor máximo de metano produzido no sistema: 4,712 mmoles CH_4/L

Valores teóricos de metano, se todas as fontes orgânicas (etanol) fossem diretamente transformadas em metano: etanol = 8,5 mmoles/L

A Tabela 21 mostra os valores de AME calculados para o Ensaio 1.

TABELA 21 - Valores de AME para o Ensaio 1

Condições	Valor de AME (mmoles de $\text{CH}_4/\text{g SSV.h}$)
RAOV 1	0,0412
RAOV 2	0,0162
RAOVP 3	0,05752
RAOVP 4	0,05778
RP 9	0,0116
RP 10	0,0177

RAOV - reator contendo ácidos orgânicos voláteis; RAOVP - reator contendo ácidos orgânicos voláteis e pentaclorofenol; RP - reator contendo pentaclorofenol; AME - atividade metanogênica específica.

A Tabela 22 mostra os valores calculados de remoção de PCP durante o ensaio 1. Os intermediários da degradação do PCP foram indicados como TCP e DCP.

TABELA 22 - Remoção de pentaclorofenol durante o primeiro ensaio de enriquecimento

Condições	Tempo de incubação (dias)	PCP remanescente - reator e sua réplica (mg/L)	% de remoção de PCP - reator e sua réplica (mg/L)	Intermediários da degradação - reator e sua réplica (mg/L)
AOV+PCP	18	(- / ND)	(NC / NC)	TCP
AOV+PCP	18	(- / ND)	(NC / NC)	TCP
glicose+PCP	18	(0,51 / 0,61)	(79 / 75)	TCP
glicose+PCP	18	(0,52 / 0,43)	(79 / 82)	TCP/DCP
PCP	18	(0,53 / 0,63)	(78 / 74)	TCP/DCP
PCP	18	(ND / ND)	(NC / NC)	TCP

AOV - ácidos orgânicos voláteis; PCP - pentaclorofenol; TCP - triclorofenol; DCP - diclorofenol (ND) PCP não detectado; (-) PCP traço; (NC) não calculado devido as baixas concentrações de PCP encontradas. Concentrações inicial de PCP de 2,5 mg/L

O primeiro ensaio de enriquecimento foi baseado em três orientações a saber: (a) a literatura (HENDRIKSEN et al., 1992 e WU et al., 1993), em que os autores avaliaram o efeito do pentaclorofenol em lodos granulados mesófilos; HENDRIKSEN et al. (1992), estudaram o efeito da glicose (0,9 g/L) em lodos não adaptados previamente no composto a ser degradado, PCP (3 a 4,5 mg/L), e também na presença de fenol; os resultados de HENDRIKSEN et al. (1992) confirmaram a degradação eficiente do PCP na presença de glicose, sem contudo afirmar qual a via para a ocorrência da desalogenação do PCP; WU et al. (1993) que verificaram que os lodos adaptados ou não em PCP foram capazes de desalogenar de 40 a 60 mg de PCP/L na presença de AOV e metanol; (b) trabalho experimental do grupo do LPA, fundamentalmente o de LARIZZATTI (1997), que verificou a degradação de PCP por lodos anaeróbios mesófilos adaptados, como descrito por WU et al. (1993); (c) considerar os substratos orgânicos presentes na vinhaça como açúcares, álcoois e AOV.

Considerando os cálculos efetuados de atividade metanogênica específica (AME), a partir dos valores de metano alcançados em cada condição do Ensaio 1 (Tabela 21), com exceção do substrato glicose, verifica-se que os maiores valores foram atingidos na presença de AOV, etanol e PCP. Os valores calculados nas réplicas foram próximos, com exceção de uma das réplicas contendo apenas os AOV (controle). É provável que a presença do AOV e do etanol em conjunto possibilitou uma melhor interação dos grupos bacterianos no consórcio estudado em relação a

produção de metano. É certo que o PCP na concentração estudada de 2,5 mg/L não prejudicou a metanogênese, considerados os valores de AME de um dos reatores controle (0,0412 mmolesCH₄/gSSV.h) e a média dos valores de AME para os reatores contendo PCP, AOV e etanol (0,0577 mmolesCH₄/gSSV.h ±0,0002), bem como os valores de AME na presença de PCP e etanol (0,015 mmolesCH₄/gSSV.h ±0,004). Em relação à produção de metano, pode-se fazer uma comparação entre os reatores controle com os reatores que continham PCP, AOV e etanol, mostrando que os reatores contendo PCP tiveram uma maior produção de metano, de até 16 mmoles/L (RAOVP4), quando comparados com os controles, os quais tiveram uma produção máxima de metano entre 7 e 10 mmoles/L. A produção de metano nos reatores que continham glicose e PCP foi muito baixa, pois a quantidade máxima de metano produzida não ultrapassou 0,543 mmoles CH₄/L durante um período de 200 horas de incubação. Dessa maneira, esses reatores não atingiram valores de metano esperados passíveis de cálculos teóricos. A situação dos reatores que continham somente glicose não se diferenciou em relação a produção de metano dos reatores contendo glicose e PCP, atingindo um valor máximo de produção de 0,504 mmoles/L. O Anexo 3 apresenta os valores de metano nos reatores e réplicas contendo PCP e glicose e somente glicose.

Comparando-se os resultados obtidos entre as réplicas, tem-se que as porcentagens de remoção de PCP nos frascos de reação, em todas as condições estudadas, foram bastante semelhantes. Ao final de 18 dias de incubação foram observadas quantidades traço¹ de PCP nos reatores contendo AOV e etanol, e em média 76% de remoção do PCP nos frascos com apenas etanol, sendo que em sua réplica ocorreu remoção próxima a 100%, mostrada pelas quantidades traço¹ encontradas. Nos frascos contendo PCP e glicose a remoção do composto halogenado esteve na faixa de 75 a 82%. Foram constatados dois intermediários da degradação do PCP, o diclorofenol (DCP) e o triclorofenol (TCP), como observado na Tabela 22.

¹Quantidades traço consideradas dentro do limite de detecção das condições das análises cromatográficas.

Uma possível explicação para as diferentes porcentagens de remoção apresentadas pelos reatores contendo somente PCP, nos tempos de incubação estudados, pode estar relacionada com a quantidade inicial de inóculo nos sistemas, uma vez que lodos anaeróbios são geralmente granulados, o que pode dificultar a homogeneização dos mesmos antes da inoculação. No enriquecimento em que os reatores continham PCP e etanol, a degradação desse composto, sem a adição de fontes de carbono (AOV ou glicose), pode ser explicada devido a presença de algumas substâncias orgânicas extras diluídas na porção líquida do inóculo, ou então pela presença de etanol. LARSEN et al. (1991), afirmaram a grande importância desse álcool nas altas taxas de desalogenação encontradas durante estudos com 7,5 e 37,5 μM de PCP.

HENDRIKSEN et al. (1992), discutiram o uso da glicose na desalogenação do PCP em reatores UASB. Um reator recebeu glicose (0,9 g/L) como fonte adicional de carbono, e um reator controle foi usado sem glicose. O reator com glicose tinha uma concentração de PCP de 4,5 mg/L e o controle de 3 mg/L. Ambos os reatores foram inoculados com lodo granular previamente adaptado a glicose. Depois de 10 meses de operação, o reator contendo glicose apresentou uma porcentagem de remoção de PCP de 99% e o controle uma remoção entre 32 a 77%. A quantidade de biomassa no reator com glicose aumentou em 150% em comparação com o reator controle, no qual não houve aumento de massa microbiana. Os autores desse trabalho não relacionaram a remoção de PCP com produção de metano, mas mesmo assim afirmaram que testes com culturas em batelada na presença de glicose teriam um efeito estimulatório na desalogenação do PCP.

Apesar dos bons resultados obtidos com o uso da glicose na degradação do PCP no primeiro ensaio do presente trabalho, os reatores contendo AOV e aqueles contendo somente etanol, apresentaram melhores valores de remoção de PCP em relação àqueles reatores que continham glicose, além da produção de metano que também foram bem melhores. Dessa maneira, o segundo ensaio não testou mais o uso da glicose (Tabela 8 - Materiais e Métodos), havendo então a preocupação de se

verificar o desempenho dos reatores que continham AOV e etanol e somente etanol na remoção do PCP.

A segunda alimentação e troca das tampas dos frascos reatores (procedimentos citados no item 4.3.3 do capítulo de Materiais e Métodos) no ensaio 1, não resultaram em produção de metano, provavelmente pela quantidade de matéria orgânica disponível e também devido a algum distúrbio ocorrido nos reatores pois antes da troca das tampas e da 2ª alimentação o lodo de alguns reatores estavam com a cor alterada, isto é, a cor não era tipicamente preta e sim marrom. Dessa maneira, o primeiro ensaio foi paralisado dando-se então prosseguimento ao segundo ensaio.

O segundo ensaio teve a duração de 7 dias. Dentro desse período de incubação, a remoção do PCP foi bastante satisfatória, assim como a produção de metano. As Figuras de 13 a 17 e Tabelas de 23 a 27 mostram a produção de metano durante o segundo ensaio e a Tabela 28 apresenta a remoção de PCP. No Anexo 3 estão mostrados os cálculos de produção de metano em mmoles/L, como já citado para o ensaio 1.

TABELA 23 - Valores de metano obtidos durante o Ensaio 2 - RAOVP1, primeiras 125 h de incubação, a $55 \pm 2^\circ\text{C}$

Tempo (h)	Cálculo final (mmoles/Lc)
0	0
14,5	1,334
17,5	2,216
35,5	6,987
38,5	8,655
62,5	12,502
78,0	12,887
127,5	12,874

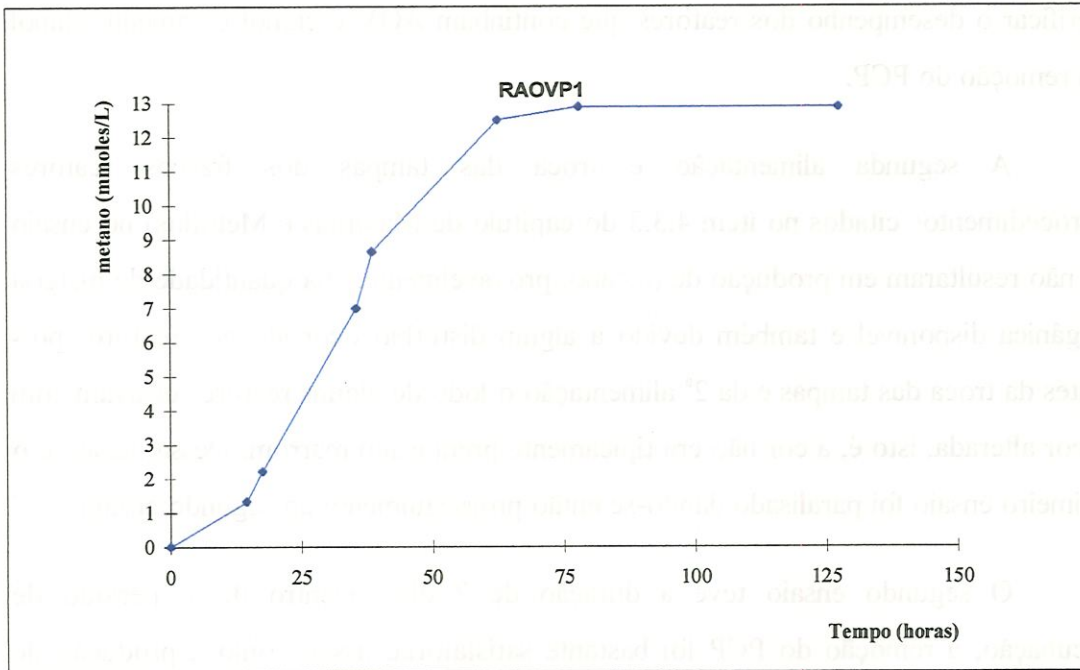


FIGURA 13 - Representação gráfica da curva de produção de metano (mmoles/L) - Ensaio 2

Intervalo de pontos escolhidos (tempo): 14,5 a 62,5h, com exceção do ponto 38,5h

Equação da reta que representa a AM: $CH_4 = 0,2323x - 1,7915$ $r^2 = 0,995$

Valor de AM: 0,2323 mmoles CH_4 /L.h

Valor de AME, considerando o valor de SSV = 2,3 g/L utilizado no ensaio: 0,101 mmoles de CH_4 /g SSV.h

Valor máximo de metano produzido no sistema: 12,887 mmoles CH_4 /L

Valores teóricos de metano, se todas as fontes orgânicas (AOV+etanol) fossem diretamente transformadas em metano: AOV+etanol = 26 mmoles/L

TABELA 24 - Valores de metano obtidos durante o Ensaio 2 - RAOVP2, primeiras 125 h de incubação, a $55 \pm 2^\circ C$

Tempo (h)	Cálculo final (mmoles/Lc)
0	0
14,5	0,573
17,5	0,821
35,5	2,147
38,5	2,729
57,5	7,075
62,5	8,518
78,0	11,435
103,5	12,743
127,5	11,032

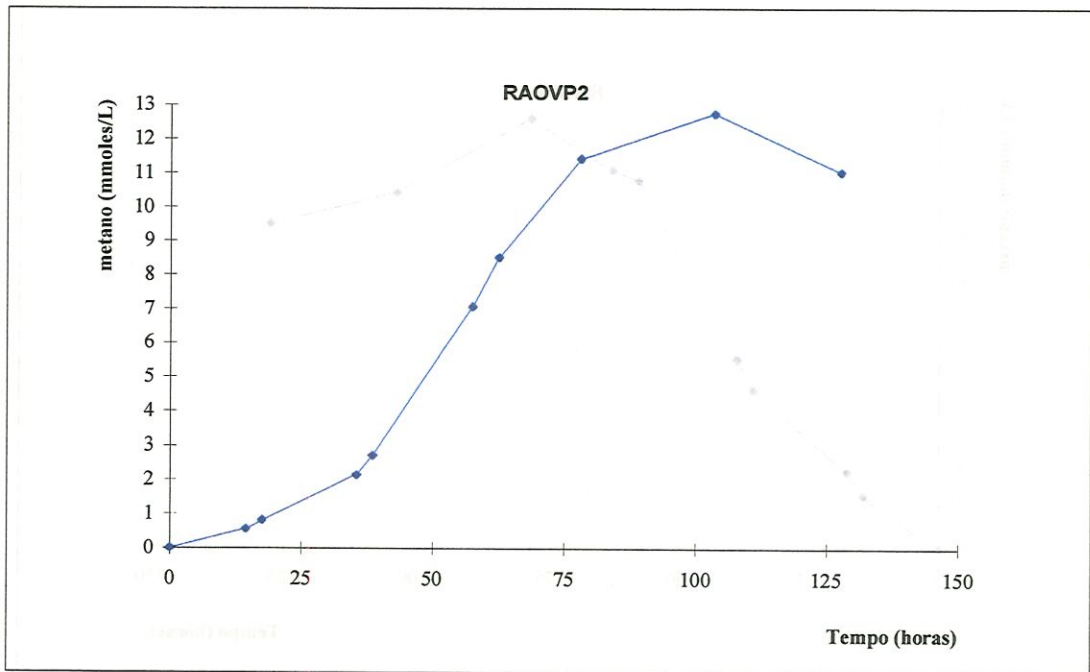


FIGURA 14 - Representação gráfica da curva de produção de metano (mmoles/L) - Ensaio 2

Intervalo de pontos escolhidos (tempo): 35,5 a 78h

Equação da reta que representa a AM: $CH_4 = 0,2229x - 5,7424$ $r^2 = 0,9973$

Valor de AM: 0,2229 mmoles $CH_4/L.h$

Valor de AME, considerando o valor de SSV = 2,3 g/L utilizado no ensaio: 0,0969 mmoles de CH_4/g SSV.h

Valor máximo de metano produzido no sistema: 12,743 mmoles CH_4/L

Valores teóricos de metano, se todas as fontes orgânicas (AOV+etanol) fossem diretamente transformadas em metano: AOV+etanol = 26 mmoles/L

TABELA 25 - Valores de metano obtidos durante o Ensaio 2 - RAOV4, primeiras 125 h de incubação, a $55 \pm 2^\circ C$

Tempo (h)	Cálculo final (mmoles/Lc)
0	0
14,5	1,200
17,5	1,737
35,5	3,551
38,5	4,255
57,5	8,280
62,5	8,512
78,0	9,676
103,5	8,004
127,5	7,304

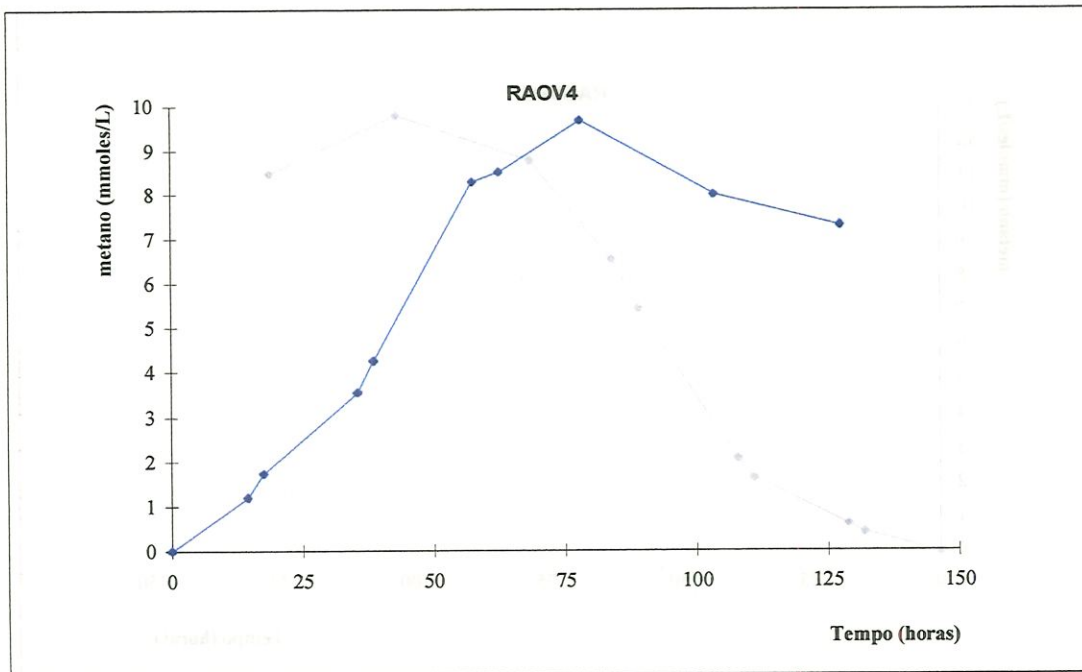


FIGURA 15 - Representação gráfica da curva de produção de metano (mmoles/L) - Ensaio 2

Intervalo de pontos escolhidos (tempo): 14,5 a 57,5h

Equação da reta que representa a AM: $CH_4 = 0,1573x - 1,3392$ $r^2 = 0,9619$

Valor de AM: 0,1573 mmoles $CH_4/L.h$

Valor de AME, considerando o valor de SSV = 2,3 g/L utilizado no ensaio: 0,0684 mmoles de CH_4/g SSV.h

Valor máximo de metano produzido no sistema: 9,676 mmoles CH_4/L

Valores teóricos de metano, se todas as fontes orgânicas (AOV) fossem diretamente transformadas em metano: AOV = 17,5 mmoles/L

TABELA 26 - Valores de metano obtidos durante o Ensaio 2 - RP5, primeiras 125 h de incubação, a $55 \pm 2^\circ C$

Tempo (h)	Cálculo final (mmoles/Lc)
0	0
14,5	0,593
17,5	0,954
35,5	2,961
38,5	3,496
57,5	3,720
62,5	3,621
78,0	3,777
103,5	3,571
127,5	3,315

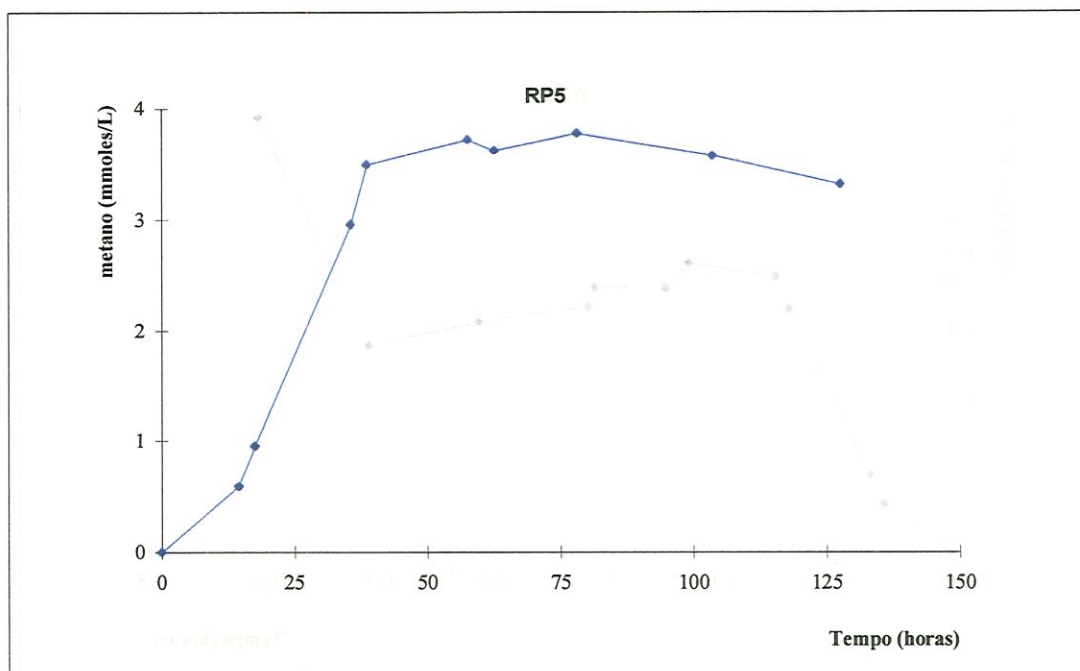


FIGURA 16 - Representação gráfica da curva de produção de metano (mmoles/L) - Ensaio 2

Intervalo de pontos escolhidos (tempo): 14,5 a 38,5h

Equação da reta que representa a AM: $\text{CH}_4 = 0,1176x - 1,1144$ $r^2 = 0,9973$

Valor de AM: 0,1176 mmoles $\text{CH}_4/\text{L}\cdot\text{h}$

Valor de AME, considerando o valor de SSV = 2,3 g/L utilizado no ensaio: 0,0511 mmoles de $\text{CH}_4/\text{g SSV}\cdot\text{h}$

Valor máximo de metano produzido no sistema: 3,777 mmoles CH_4/L

Valores teóricos de metano, se todas as fontes orgânicas (etanol) fossem diretamente transformadas em metano: etanol = 8,5 mmoles/L

TABELA 27 - Valores de metano obtidos durante o Ensaio 2 - RP6, primeiras 125 h de incubação, a $55 \pm 2^\circ\text{C}$

Tempo (h)	Cálculo final (mmoles/Lc)
0	0
14,5	0,667
17,5	1,048
35,5	3,298
38,5	3,748
57,5	3,920
62,5	3,583
78,0	3,590
79,5	3,321
103,5	3,113
127,5	2,795
152,0	5,877

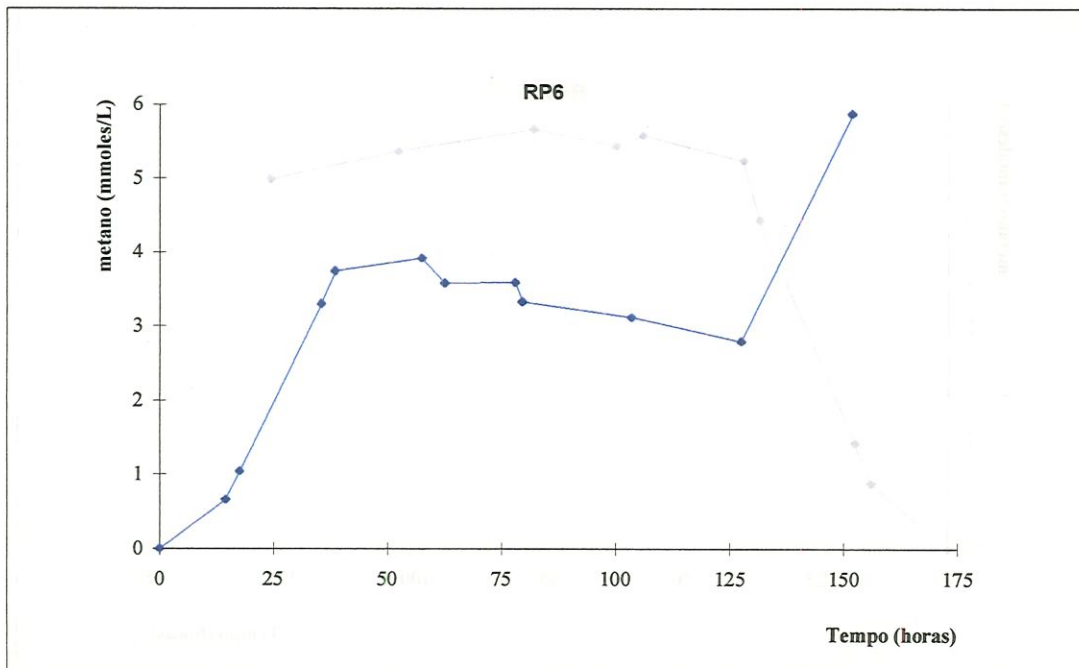


FIGURA 17 - Representação gráfica da curva de produção de metano (mmoles/L) - Ensaio 2

Intervalo de pontos escolhidos (tempo): 14,5 a 38,5h

Equação da reta que representa a AM: $CH_4 = 0,1271x - 1,1793$ $r^2 = 0,9997$

Valor de AM: 0,1271 mmoles $CH_4/L.h$

Valor de AME, considerando o valor de SSV = 2,3 g/L utilizado no ensaio: 0,0552 mmoles de CH_4/g SSV.h

Valor máximo de metano produzido no sistema: 5,877 mmoles CH_4/L

Valores teóricos de metano, se todas as fontes orgânicas (etanol) fossem diretamente transformadas em metano: etanol = 8,5 mmoles/L

TABELA 28 - Remoção de pentaclorofenol durante o segundo ensaio de enriquecimento

Condições	Tempo de incubação (dias)	PCP remanescente - reator e sua réplica (mg/L)	% de remoção de PCP - reator e sua réplica (mg/L)	Intermediários da degradação - reator e sua réplica (mg/L)
AOV+PCP	7	(1,30 / 1,10)	(48 / 56)	TCP
AOV+PCP	7	(1,16 / 1,27)	(53,6 / 49,2)	TCP
PCP	7	(1,33 / 1,27)	(46,8 / 49,2)	TCP
PCP	7	(1,20 / 1,03)	(52 / 58,8)	TCP

AOV - ácidos orgânicos voláteis; PCP - pentaclorofenol; TCP - triclorofenol
Concentrações inicial de PCP de 2,5 mg/L

Analisando-se a Tabela 28, é possível indicar que no período de 7 dias de incubação cerca de 50% do PCP foi removido na presença de AOV e etanol, ou apenas etanol, e, portanto, a remoção do PCP tenha ocorrido em tempos inferiores aos 18 dias de incubação do primeiro ensaio. As réplicas apresentaram valores de remoção de PCP bastante semelhantes, reforçando a sua qualidade. A maior

porcentagem de remoção de PCP ocorreu nos reatores contendo somente etanol, chegando a quase 60%. No ensaio 2, o intermediário observado através das análises cromatográficas foi o TCP.

Estudos realizados com compostos tóxicos sugerem que estes têm um efeito negativo no desenvolvimento de grânulos de reatores UASB, mas grânulos anaeróbios podem se desenvolver na presença desses compostos tóxicos, tais como o PCP, desde que AOV e metanol estejam presentes como co-substratos (WU et al., 1993).

Além do metanol, citado por WU et al. (1993), o etanol também pode ser um co-substrato importante na desalogenação do PCP segundo estudos de LARSEN et al. (1991), já citados e que reforçaram que sedimentos com uma baixa temperatura original (10 a 15°C) possuem um maior potencial de desalogenação a uma temperatura termofílica, quando comparados com amostras de ambientes mesofílicos e termofílicos. Por outro lado, o presente trabalho produziu resultados diferentes dos obtidos pelos autores acima referidos, pois o lodo usado foi oriundo de um biodigestor termofílico (5000 m³) operando com vinhaça, de modo que a temperatura original desse inóculo, quando coletado, estava em torno de 55-57°C e foi mantida durante todo o trabalho experimental por volta de 55±2°C. Essa temperatura foi muito satisfatória para o processo de remoção do PCP nas concentrações estudadas. Através do uso do etanol e de AOV, 2,5 mg/L de PCP foi removido através de condições termofílicas com um lodo granular não adaptado proveniente de um digestor operando com vinhaça. Esse lodo granular também pode ter fornecido condições para que houvesse uma boa porcentagem de remoção do PCP, seja pela presença de doadores de elétrons já existentes nesse inóculo e que foram capazes de promover a desalogenação do PCP, seja por uma outra condição que faz com que esse lodo tenha competência na degradação.

Em condições anaeróbias, PCP tem sido um inibidor da metanogênese e da degradação de ácidos orgânicos voláteis (McALLISTER et al., 1996). WU et al. (1993) citaram a inibição da atividade das acetogênicas e metanogênicas na concentração de 1 a 2,5 mg PCP/L em grânulos que degradam ácidos orgânicos

voláteis. A inibição da atividade dos grânulos que degradam AOV e PCP foi determinada através de testes de produção de metano. Esses autores constataram, também, que os grânulos que degradaram PCP quando pré-expostos ao PCP, apresentaram uma diminuição na inibição da produção de metano. As concentrações de PCP a que foram submetidos os ensaios do trabalho presente não foram inibitórias aos grânulos não adaptados, isto é, os grânulos não precisaram ser previamente expostos ao PCP para que houvesse a degradação.

A produção de metano foi um dos fatores considerados para se avaliar a inibição do inóculo ao PCP. Foram calculadas AM e AME para os ensaios de enriquecimento e segundo as Tabelas 21, 29 e 33 que representam as AME para cada ensaio, constatou-se que não ocorreu inibição do lodo não adaptado. Em relação a essa produção de metano no ensaio 2, verifica-se que os quatro sistemas de reação, apresentaram valores desse gás próximos aos calculados para cada condição estudada (ver valores teóricos abaixo de cada Figura, de 13 a 17). Como anteriormente observado para o Ensaio 1, a presença de AOV e etanol em conjunto favoreceu o lodo granulado, constatado pelos valores calculados de AME (Tabela 29) das réplicas, respectivamente 0,101 e 0,0969 mmoles de $\text{CH}_4/\text{gSSV.h}$. Uma das réplicas contendo apenas AOV (controle) apresentou um valor de AME de 0,0684 mmoles de $\text{CH}_4/\text{gSSV.h}$ (não foi possível calcular o valor de AME para as duas réplicas, pois uma delas apresentou uma fase muito longa de resposta, cerca de 140 h para iniciar a produção de metano – Anexo 3, apesar de atingir quantidades próximas a 17 mmoles/L desse gás, ao final do período de incubação de 160h). Os valores de AME para os frascos de reação contendo apenas etanol e PCP foram em média de 0,0532 mmoles de $\text{CH}_4/\text{gSSV.h} \pm 0,0029$. Os resultados do Ensaio 2 confirmaram a remoção de PCP sob condições metanogênicas, como verificado no Ensaio 1.

Os diferentes valores de AME encontrados para os lodos granulados nos Ensaios 1 e 2, sob condições semelhantes de incubação, podem ser justificados pelas diferenças do lodo, conseqüentes da forma de inoculação do mesmo nos frascos de reação. O lodo granulado anaeróbico não é facilmente homogeneizado previamente à sua distribuição em frascos. É bem provável que diferenças tenham ocorrido em

relação a quantidade de massa celular inoculada em ambos os ensaios. Os valores de AM (abaixo de cada Figura), que não consideram o valor de SSV de 2,3g/L para o cálculo da velocidade de produção de metano, valor esse estimado para os inóculos em todos os frascos de reação a partir do SSV do lodo coletado na Usina, mostram que há diferenças na AM para os lodos granulados de mesma origem cultivados em condições semelhantes. Assim, a dificuldade na distribuição do lodo nos frascos de reação pode justificar os diferentes valores de atividade entre ensaios. Salienta-se que no mesmo ensaio, essa diferença entre os valores é minimizada pela manipulação imposta no instante de cada ensaio.

TABELA 29 - Valores de AME para o Ensaio 2

Condições		Valor de AME (mmoles de CH ₄ /g SSV.h)
RAOVP	1	0,101
	2	0,0969
RAOV	3	-
	4	0,0684
RP	5	0,0511
	6	0,0552

RAOV - reator contendo ácidos orgânicos voláteis; **RAOVP** - reator contendo ácidos orgânicos voláteis e pentaclorofenol; **RP** - reator contendo pentaclorofenol; - AME não calculada.

O terceiro ensaio procurou avaliar, além da degradação de PCP frente aos AOV e etanol, a presença de bactérias redutoras do íon sulfato no sistema, visto sua indicação como responsáveis pela degradação de PCP, em certos artigos (KENNES et al., 1996; KOHRING et al., 1989). No entanto, os ensaios na presença de sulfato não tiveram como objetivo verificar a presença de uma bactéria redutora de sulfato capaz de agir sobre o organohalogenado PCP, mas sim verificar se uma população que reduz sulfato a sulfeto estaria presente no sistema dada a disponibilidade de substratos orgânicos ácidos. Nesse caso, a atividade dessas bactérias poderia afetar a metanogênese do lodo granulado estudado.

As Tabelas de 30 a 32 e Figuras de 18 a 20 indicam qual foi o comportamento desse terceiro ensaio em relação a produção de metano. O Anexo 3 mostra as Tabelas contendo os cálculos feitos para transformar a área de metano obtida pelo cromatógrafo em mmoles/L.

TABELA 30 - Valores de metano obtidos durante o Ensaio 3 - RAOVP1, 463,5 h de incubação, a 55±2°C

Tempo (h)	Cálculo final (mmoles/Lc)
0	0
6	0,350
23	1,137
28,5	1,811
49	2,302
68,5	3,503
77	3,701
100	6,098
123	11,436
150	11,185
169,5	12,741
173,5	13,191
189	15,643
196	15,502
214,5	13,738
219,5	14,051
244	14,025
270,5	12,571
294,5	13,192
318	13,200
332	12,256
358	12,572
365	11,816
383	12,136
389	12,062
437	11,043
463,5	10,216

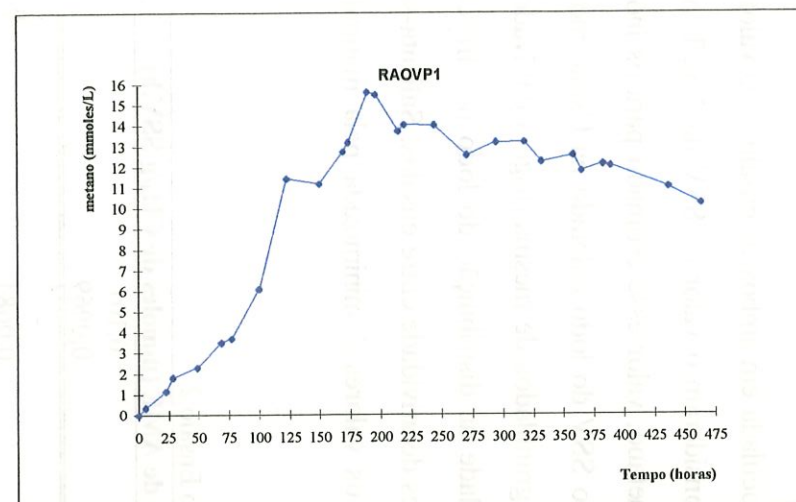


FIGURA 18 - Representação gráfica da curva de produção de metano (mmoles/L) - Ensaio 3

Intervalo de pontos escolhidos: 23 a 100h

Equação da reta que representa a AM: $CH_4 = 0,0579x - 0,2479$ $r^2 = 0,9445$

Valor de AM: 0,0579 mmoles $CH_4/L.h$

Valor de AME, considerando o valor de SSV = 2,3 g/L utilizado no ensaio: 0,0252 mmoles de CH_4/g SSV.h

Valor máximo de metano produzido no sistema: 14,051 mmoles CH_4/L

Valores teóricos de metano, se todas as fontes orgânicas (AOV+etanol) fossem diretamente transformadas em metano:

AOV+etanol = 26,0 mmoles/L

TABELA 31 - Valores de metano obtidos durante o Ensaio 3 - RAOV3, 463,5 h de incubação, a $55\pm 2^\circ\text{C}$

Tempo (h)	Cálculo final (mmoles/Lc)
0	0
6	0,388
23	1,033
28,5	1,346
49	3,103
68,5	7,401
77	8,410
100	9,520
150	10,273
169,5	9,789
173,5	9,805
189	10,025
214,5	9,608
219,5	9,736
244	11,447
270,5	12,107
294,5	14,050
318	14,395
332	15,280
358	14,877
383	14,444
389	14,075
437	14,213
452,5	14,000
463,5	12,926

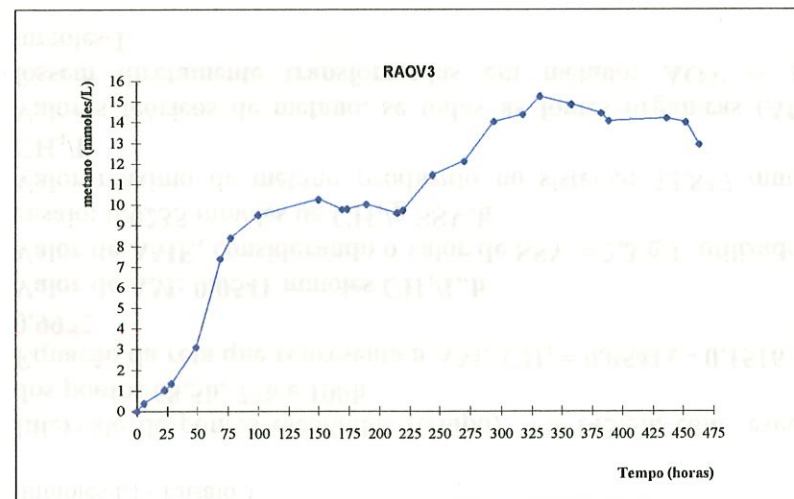


FIGURA 19 - Representação gráfica da curva de produção de metano (mmoles/L) - Ensaio 3

Intervalo de pontos escolhidos: 23 a 77h

Equação da reta que representa a AM: $\text{CH}_4 = 0,142x - 2,7301$; $r^2 = 0,9637$

Valor de AM: 0,142 mmoles $\text{CH}_4/\text{L}\cdot\text{h}$

Valor de AME, considerando o valor de SSV = 2,3 g/L utilizado no ensaio: 0,0617 mmoles de $\text{CH}_4/\text{g SSV}\cdot\text{h}$

Valor máximo de metano produzido no sistema: 15,280 mmoles CH_4/L

Valores teóricos de metano, se todas as fontes orgânicas (AOV) fossem diretamente transformadas em metano: $\text{AOV} = 17,5$ mmoles/L

TABELA 32 - Valores de metano obtidos durante o Ensaio 3 - RAOVSO₄⁻², 463,5 h de incubação, a 55±2°C

Tempo (h)	Cálculo final (mmoles/Lc)
0	0
6	0,369
23	0,953
28,5	1,223
49	2,600
68,5	5,441
77	6,156
100	7,517
143,5	7,629
189	8,393
244	8,861
270,5	8,752
288,5	9,100
311	9,282
341	9,784
365	10,829
383	11,475
389	11,887
417	12,050
437	12,606
452,5	12,817
463,5	12,177

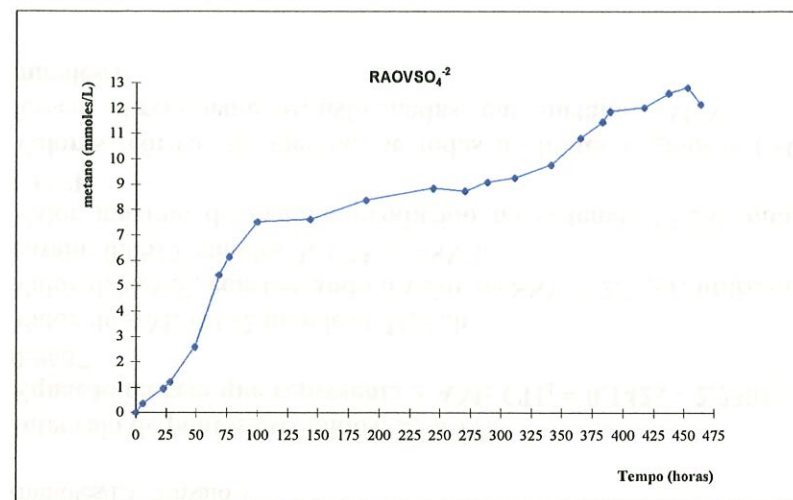


FIGURA 20 - Representação gráfica da curva de produção de metano (mmoles/L) - Ensaio 3

Intervalo de pontos escolhidos (tempo): 6 a 143,5h, com exceção dos pontos 68,5h, 77h e 100h

Equação da reta que representa a AM: $CH_4 = 0,0541x - 0,1516$ $r^2 = 0,9972$

Valor de AM: 0,0541 mmoles CH₄/L.h

Valor de AME, considerando o valor de SSV = 2,3 g/L utilizado no ensaio: 0,0235 mmoles de CH₄/g SSV.h

Valor máximo de metano produzido no sistema: 12,817 mmoles CH₄/L

Valores teóricos de metano, se todas as fontes orgânicas (AOV) fossem diretamente transformadas em metano: AOV = 17,5 mmoles/L

Os reatores com produção de metano da ordem de 16 mmoles/L (réplicas com produção máxima de 15,643 e 16,618 mmoles/L) foram os que continham lodo granulado cultivado em AOV, etanol e PCP. No entanto, em uma das réplicas a produção de metano ocorreu em tempos superiores a 300 h de incubação, sendo que na outra o tempo para a produção máxima se deu em 200 h. Nos Ensaio 1 e 2, a produção máxima de metano foi verificada em tempos entre 100 e 200 h de incubação. Assim, para o cálculo da AME, (Tabela 33) considerou-se apenas os valores do frasco com produção máxima de metano igual a 15,643 mmoles/L, ocorrida em 200 h de incubação. Nesse caso a AME obtida foi de 0,0252 mmoles de $\text{CH}_4/\text{gSSV.h}$. Para o controle, que recebeu apenas AOV a AME foi de 0,0617 mmoles de $\text{CH}_4/\text{gSSV.h}$, com uma produção máxima de metano de 15,280 mmoles/L. Na presença de sulfato de sódio e AOV a AME calculada foi de 0,0235 mmoles de $\text{CH}_4/\text{gSSV.h}$, com uma produção máxima de metano da ordem de 12,817 mmoles/L. Os valores máximos de metano encontrados no Ensaio 3 não foram distantes dos teoricamente calculados (ver abaixo das Figuras 18 a 20).

TABELA 33 - Valores de AME para o Ensaio 3

Condições	Valor de AME (mmoles de $\text{CH}_4/\text{g SSV.h}$)
RAOVP 1	0,0252
2	-
RAOV 3	0,0617
RSO_4^{-2} 4	0,0235

RAOV - reator contendo ácidos orgânicos voláteis; RAOVP - reator contendo ácidos orgânicos voláteis e pentaclorofenol; RSO_4^{-2} - reator contendo sulfato; - AME não calculada

Nesse ensaio, a remoção de PCP foi determinada após 19 dias de incubação, constatando-se apenas quantidades traço do composto halogenado e TCP como composto intermediário, como mostrado na Tabela 34.

TABELA 34 - Remoção de pentaclorofenol no terceiro ensaio de enriquecimento, a $55\pm 2^\circ\text{C}$

Condições	Tempo de incubação (dias)	PCP remanescente - reator e sua réplica (mg/L)	% de remoção de PCP - reator e sua réplica (mg/L)	Intermediários da degradação - reator e sua réplica (mg/L)
AOV+PCP	19	(ND / -)	(NC / NC)	TCP
AOV+PCP	19	(- / ND)	(NC / NC)	TCP

PCP - pentaclorofenol; AOV - ácidos orgânicos voláteis; TCP - triclorofenol; (ND) - PCP não detectado; (-) PCP traço; (NC) não calculado devido as baixas concentrações de PCP encontradas. Concentração inicial de PCP de 2,5 mg/L

Apesar da adequada remoção de PCP ocorridas nesse terceiro ensaio, os valores de AME do Ensaio 3 diferiram dos valores encontrados nos Ensaio 1 e 2, no que se refere à presença dos substratos em conjunto, AOV, etanol e PCP. A AME de uma das réplicas, nesse caso, foi inferior a determinada para o frasco controle, e com valor semelhante ao do frasco contendo sulfato. Pode-se afirmar que a adição de sulfato não afetou a metanogênese, e as diferenças em relação aos primeiros ensaios podem estar na inoculação dos sistemas de reação, como justificado anteriormente. O sulfato está geralmente presente em quantidades elevadas na vinhaça, da ordem de 0,60 g/L (VAZOLLER, 1995), e como o lodo granulado estudado foi originado de um biodigestor anaeróbico termofílico tratando vinhaça, supôs-se que a metanogênese fosse afetada na presença de sulfato (0,96g/L), razão pela qual houve o enriquecimento das culturas em sulfato de sódio no terceiro ensaio. A existência da redução do sulfato pelo lodo granulado estudado poderia indicar atividade de sulfato-redutoras, o que indicaria um caminho para identificação de bactérias desalogenantes no lodo (McALLISTER *et al.*, 1996).

Dois aspectos são relevantes para a confirmação da remoção do PCP sob condições metanogênicas termofílicas: a certificação da ocorrência de produção de metano nos três ensaios de enriquecimento e de intermediários da degradação do PCP. Segue-se a essa resposta, o fato de autores como LARSEN *et al.* (1991), já citados anteriormente, que mostram nos seus resultados do estudo com PCP sob condições termofílicas, que as concentrações de clorofenóis só foram determinadas

quando a produção de biogás cessou, isto é, não era mais medido de maneira alguma. Através do surgimento de intermediários da degradação do PCP, os autores também calcularam as quantidades relativas de DCP, TCP, TeCP e PCP. O ensaio realizado sobre o isolamento de culturas termófilas facilitaram também essa confirmação, como será discutido adiante.

Ao final do terceiro ensaio de enriquecimento em PCP, amostras do lodo foram examinadas sob microscopia de luz, contraste de fase e ultra-violeta, permitindo, dessa maneira, observar-se tipos morfológicos diversos selecionados ao longo desse terceiro ensaio de enriquecimento frente a diferentes situações a que o inóculo foi submetido. As Figuras 21 e 22 mostram os tipos morfológicos encontrados no enriquecimento em AOV e sulfato, respectivamente através da microscopia de fluorescência e contraste de fase. Através da Figura 21 podemos observar o predomínio de células fluorescentes e cocos. As setas indicam os bacilos fluorescentes. A Figura 22 apresenta vários bacilos de diversos tamanhos dispersos no meio de cultivo.

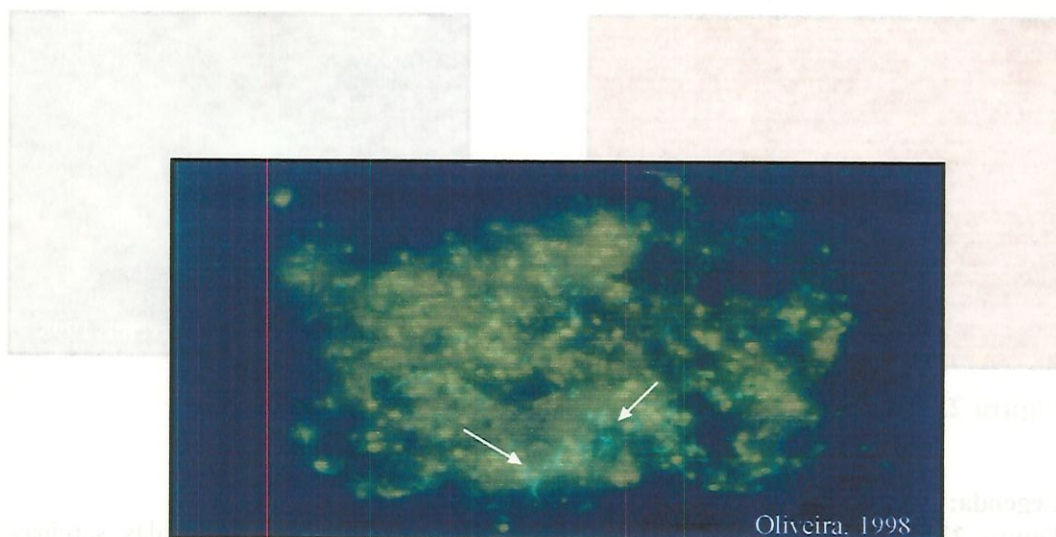


FIGURA 21- Fotomicrografia da amostra do Ensaio 3, enriquecimento em AOV e sulfato de sódio. As setas mostram bacilos fluorescentes. Observam-se também em todo o campo cocos dispersos com fluorescência “palha”. Microscopia de fluorescência: objetiva 100, ocular 10 e zoom 1,25. Tempo de incubação: 19 dias, $55\pm 2^{\circ}\text{C}$, agitação: 175 rpm

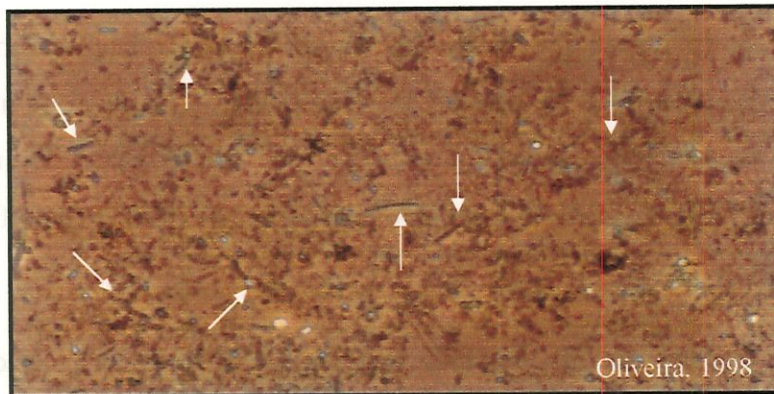


FIGURA 22- Fotomicrografia da amostra do Ensaio 3, enriquecimento em AOV e sulfato de sódio. As setas mostram bacilos de diversos tamanhos. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100, ocular 10 e zoom 1,25. Tempo de incubação: 19 dias, $55\pm 2^\circ\text{C}$, agitação: 175 rpm

Os enriquecimentos em AOV apenas mostraram que, nesse material, houve o grande desenvolvimento de sarcinas que fluoresciam sob luz ultra-violeta (Figuras 23 e 24). Nas condições em que PCP esteve presente, o desenvolvimento de sarcinas foi menos acentuado como indicado na Figura 25. Por outro lado, nesse mesmo meio de cultivo, desenvolveram-se também bacilos de tamanhos diversos. As Figuras 26 e 27 mostram os bacilos (setas brancas) e as sarcinas (setas azuis).

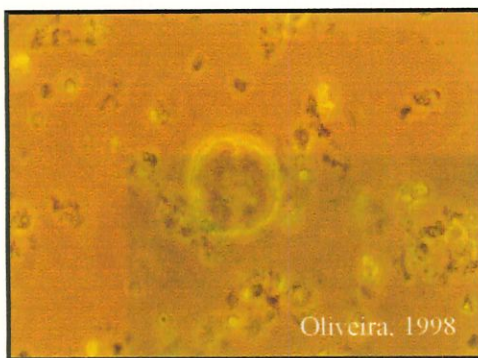


Figura 23

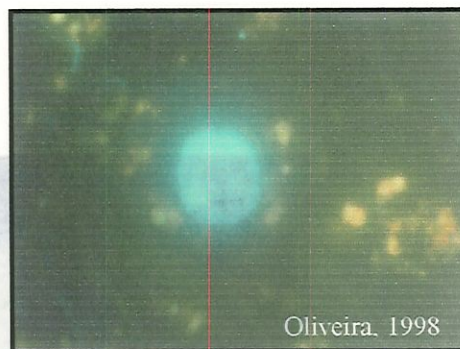


Figura 24

Legenda:

Figura 23 e 24 - Fotomicrografia da amostra do Ensaio 3. Aspectos das sarcinas no enriquecimento em AOV. Tempo de incubação: 32 dias, $55\pm 2^\circ\text{C}$, agitação: 175rpm. Microscopia de contraste de fase (Figura 23) e fluorescência (Figura 24): objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25

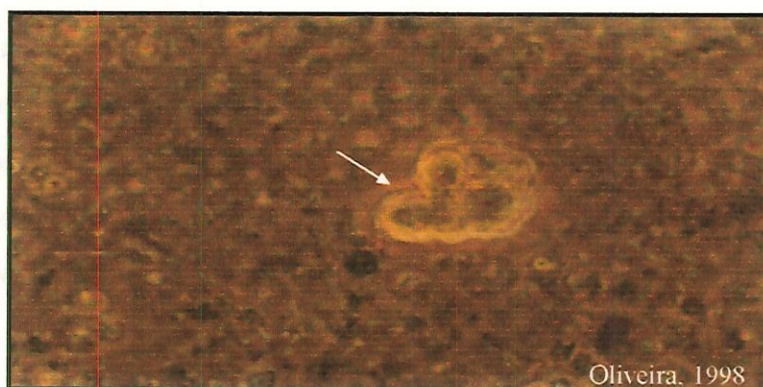


FIGURA 25 - Fotomicrografia da amostra do Ensaio 3. Aspectos das sarcinas (seta branca) no enriquecimento em AOV e PCP. Tempo de incubação: 32 dias, $55\pm 2^\circ\text{C}$, agitação: 175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25

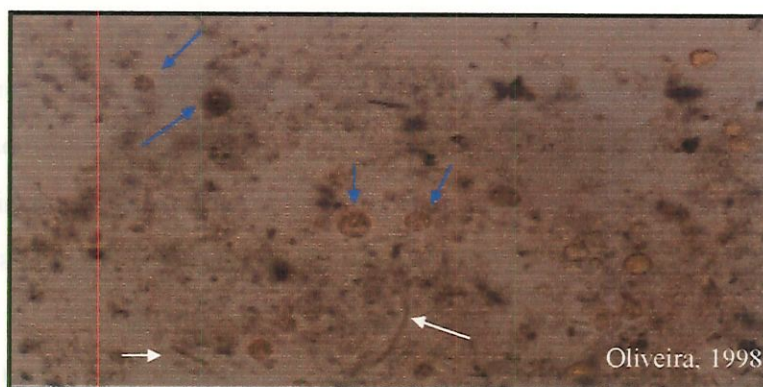


FIGURA 26 - Fotomicrografia da amostra do Ensaio 3. Aspectos das sarcinas (setas azuis) e dos bacilos (setas brancas) no enriquecimento em AOV e PCP. Tempo de incubação: 32 dias, $55\pm 2^\circ\text{C}$, agitação: 175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25

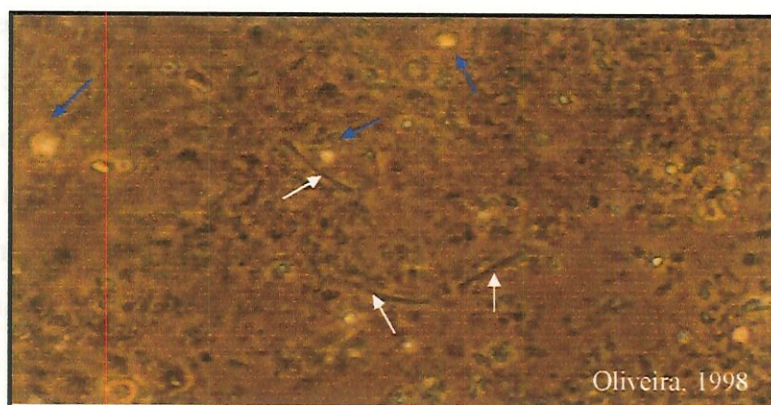


FIGURA 27 - Fotomicrografia da amostra do Ensaio 3. Aspectos das sarcinas (setas azuis) e dos bacilos (setas brancas) no enriquecimento em AOV e PCP. Tempo de incubação: 32 dias, $55\pm 2^\circ\text{C}$, agitação: 175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25

O terceiro ensaio, por ter apresentado resultados satisfatórios tanto em relação a degradação de PCP quanto em relação a produção de metano, serviu de inóculo para o ensaio de isolamento (quarto ensaio). Os inóculos foram retirados dos frascos contendo somente AOV e de frascos contendo AOV/PCP. Os frascos escolhidos foram aqueles que apresentavam uma boa produção de metano e turvação visível do meio de cultivo.

5.3 - Cultura termófila isolada

Ao longo dos três ensaios de enriquecimento das culturas anaeróbias presentes no lodo granulado, foi constatado, pelo exame microscópico de amostras dos meios contendo os substratos ácido etanol e PCP, a seleção de determinados tipos de células bacterianas. A diluição decimal seriada de alíquotas das amostras do terceiro ensaio de enriquecimento, em meio mineral contendo AOV e em meio contendo AOV, etanol e PCP, resultou em um adequado procedimento para a obtenção de culturas anaeróbias termófilas.

As diferenças básicas existentes no ensaio para a obtenção de culturas degradadoras de PCP e os de enriquecimento, foram relacionadas no item 3.2.1, do capítulo Materiais e Métodos. Foi também adicionado extrato de levedura a 2% nos cultivos subsequentes, com o fim de suprir as células de fatores de crescimento que poderiam ser limitantes ao longo dos sub-cultivos. Após a primeira série de diluições, alíquotas dos frascos que apresentaram crescimento foram diluídas na faixa de 10^{-1} a 10^{-3} . Verificado crescimento nessas diluições, alíquotas de 1 mL eram então sub-cultivadas. A presença de extrato de levedura favoreceu o crescimento das culturas, constatado pela turbidez mais intensa do meio ao longo do período de incubação.

Crescimento bacteriano foi visível na primeira série de diluições, após 11 dias de incubação a $55 \pm 2^\circ\text{C}$. A diluição 10^{-2} em meio mineral contendo AOV, etanol e PCP apresentou turvação e produção de metano de 7,49 mmoles/L. A presença de



dois tipos morfológicos de bacilos foi observada, como mostram as Figuras 28 e 29, revelando o crescimento de uma possível co-cultura. A diluição 10^{-2} foi, então, escolhida para sub-cultivo em nova série de diluições na faixa de 10^{-1} a 10^{-3} , como anteriormente mencionado. Após 14 dias de incubação, a diluição 10^{-1} com uma produção de metano de 6,43 mmoles/L apresentou a mesma cultura de bacilos, sendo um bacilo longo não fluorescente e outro menor fluorescente, mas, nesse caso, apareceram também, junto com os bacilos, sarcinas pouco desenvolvidas. Outras análises microscópicas de sub-cultivos posteriores dessa cultura, também indicaram a presença de sarcinas juntamente com os bacilos (Figura 30 e 33, respectivamente com 10 e 22 dias de incubação). Essas células em formato de sarcinas se relacionam ao gênero *Methanosarcina*, o qual não se desenvolveu muito nesse meio contendo PCP. LARIZZATTI (1997), que estudou um lodo mesófilo (35°C) na degradação do PCP, obteve ao final dos dois ensaios realizados tipos morfológicos relacionados ao gênero *Methanosarcina* em quantidade. O autor justifica que a presença desse gênero pode ser explicada pela adição de metanol nos frascos-reatores durante a alimentação com PCP.

Observou-se ao longo dos sub-cultivos realizados nesse ensaio de isolamento, que sempre foi necessário uma grande quantidade de massa celular a ser inoculada em meio novo, para que o desenvolvimento da co-cultura ocorresse, sendo obtida com intensa turvação visível do meio de cultura, geralmente constatada após 15 dias de incubação. O período de incubação dos frascos superior a 15 dias pareceu comprometer a morfologia das células. VAZOLLER, (1995) destacou a importância do tempo de incubação no decaimento das células termófilas anaeróbias, podendo ser afetadas rapidamente quando os nutrientes do meio ficam escassos, ou por algum fator limitante ao crescimento, como por exemplo decréscimo de pH. No presente trabalho não foi possível relacionar as condições que afetaram as células após 15 dias de incubação na temperatura de ensaio. As diferentes morfologias ao longo de vários su-cultivos são mostrados nas Figuras 34 e 35.

Em relação à degradação do PCP nesses ensaios de isolamento, obtiveram resultados bastante satisfatórios. A análise cromatográfica para o PCP nas amostras

onde foi obtida a co-cultura com 11 dias de incubação, foi realizada após 19 dias, tendo removido 40% do PCP. Essa amostra contendo a co-cultura de bacilos foi sub-cultivada por várias vezes, sendo atingida uma porcentagem de 46% de remoção do PCP ao final de 33 dias de incubação em diluição 10^{-1} .

Os sub-cultivos indicaram o bom desenvolvimento da co-cultura de bacilos em meio contendo ácidos, etanol e PCP. As Figuras 30, 32 e 33 mostram o aspecto morfológico das culturas presentes nesse meio em microscopia de contraste de fase. A Figura 31 mostra os bacilos fluorescentes.

Amostras submetidas à coloração de Gram resultaram em que as células da co-cultura eram Gram-negativas. McALLISTER et al. (1996), em sua revisão sobre a biodegradação do PCP, indicaram que trabalhos experimentais sobre a presença do PCP no solo mostraram a seleção de bactérias Gram negativas na comunidade microbiana. Como mencionado acima, a co-cultura apresentou bacilos Gram negativos, sendo um deles fluorescente sob luz ultra-violeta. Essa característica é comum de Archaea metanogênicas hidrogenotróficas, e a forma do bacilo fluorescente pode ser relacionada ao gênero metanogênico termófilo *Methanobacterium*, segundo Manual de Bergey de Sistemática Bacteriana (1988), cuja coloração de Gram pode ser variável. Nessa direção, é possível indicar que ocorreu produção de hidrogênio nos frascos de cultivo contendo PCP, a partir da degradação de ácidos e etanol, uma vez que esses microrganismos são hidrogenotróficos. Como já discutido, não foi possível constatar o caminho da desalogenação do PCP nos ensaios de enriquecimento, bem como nos de obtenção de culturas, mas é provável que os AOV e o etanol possam ter auxiliado como doadores de elétrons no caminho da desalogenação redutiva do composto organohalogenado. Nesse caso, poder-se-ia supor a existência de competição pelo hidrogênio entre a metanogênese hidrogenotrófica e a desalogenação redutiva do PCP. Porém, nas condições estudadas com a co-cultura, a competição parece não ter ocorrido. Também não é possível afirmar sobre os diferentes valores de metano obtidos ao final das incubações na presença e na ausência de PCP, durante alguns sub-cultivos das células, pois a quantidade inicial das células inoculadas nos meios de cultivo não foi determinada.

Concluiu-se também que as células metanogênicas em formato de sarcinas foram afetadas nos cultivos diluídos na presença de PCP.

O trabalho de VAZOLLER (1995) apontou a presença de uma Archaea metanogênica hidrogenotrófica importante nos lodos granulados de um sistema piloto de biodigestão operado com vinhaça, na mesma destilaria em que o lodo granulado desse estudo foi originado. Além disso, as sarcinas crescidas nos frascos com AOV foram também verificadas por VAZOLLER (1995) como Archaea metanogênicas importantes na digestão anaeróbia da vinhaça no sistema piloto estudado na destilaria. Portanto, tanto nos ensaios de enriquecimento como na etapa para a obtenção de culturas degradadoras de PCP, as morfologias metanogênicas observadas são comuns aos sistemas anaeróbios termofílicos tratando vinhaça, considerado o trabalho sobre esse ecossistema, realizado anteriormente pelo autor citado.

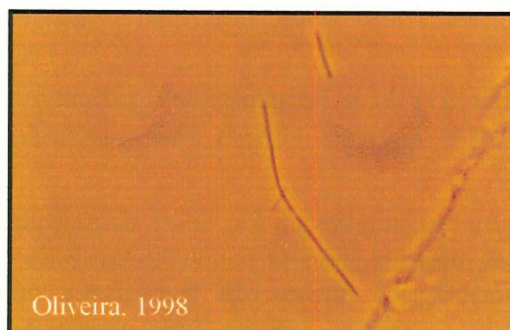


FIGURA 28



FIGURA 29

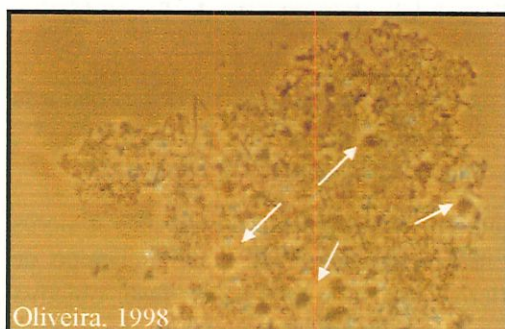


FIGURA 30

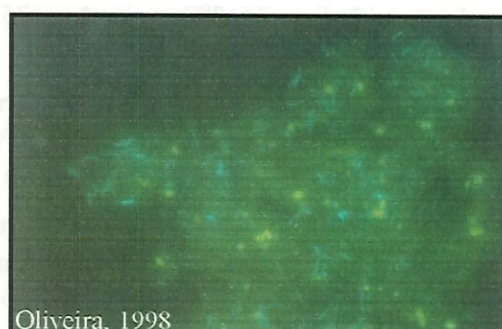


FIGURA 31

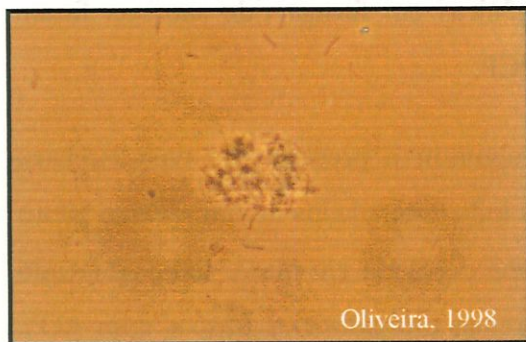


FIGURA 32

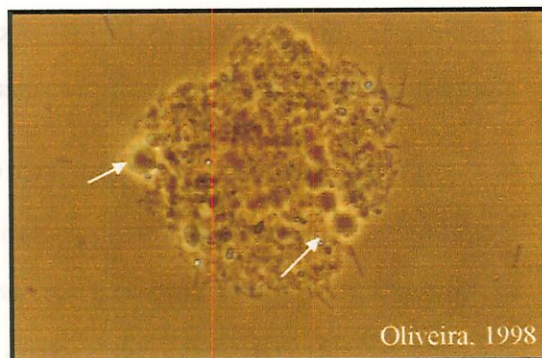


FIGURA 33

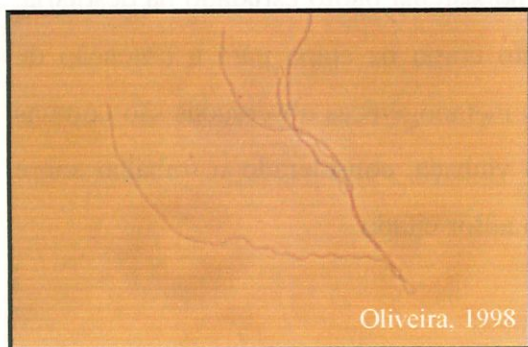


FIGURA 34

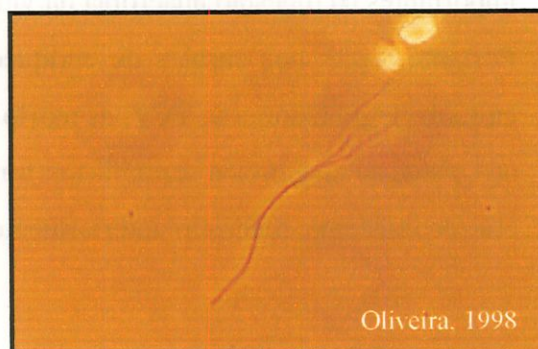


FIGURA 35

Legenda:

FIGURAS 28 e 29 - Aspectos da co-cultura de bacilos. Ensaio de isolamento, enriquecimento em AOV e PCP. Tempo de incubação: 12 dias, $55\pm 2^{\circ}\text{C}$, agitação: 175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25

FIGURAS 30 e 31 - Aspectos dos tipos morfológicos encontrados no Ensaio de isolamento no enriquecimento em AOV e PCP. As setas brancas mostram sarcinas pouco desenvolvidas (Figura 30). A Figura 31 mostra os tipos morfológicos através da microscopia de fluorescência. Tempo de incubação: 10 dias, $55\pm 2^{\circ}\text{C}$, agitação: 175rpm. Microscopia de contraste de fase (Figura 30) e fluorescência (Figura 31): objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25

FIGURA 32 - Aspecto do aglomerado de bacilos. Enriquecimento: AOV e PCP. Tempo de incubação: 12 dias, $55\pm 2^{\circ}\text{C}$, agitação: 175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25

FIGURA 33 - Aspectos das células em formato de sarcinas (setas brancas) e em formato de bacilos (aglomerado). Enriquecimento: AOV e PCP. Tempo de incubação: 22 dias, $55\pm 2^{\circ}\text{C}$, agitação: 175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25

FIGURAS 34 e 35 - Aspectos dos filamentos originados possivelmente dos bacilos maiores da co-cultura de bacilos (ensaio de isolamento). Enriquecimento: AOV e PCP. Tempo de incubação: 16 dias, $55\pm 2^{\circ}\text{C}$, agitação: 175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25

As morfologias obtidas pela microscopia de contraste de fase e fluorescência puderam ser confirmadas com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura que foi realizada somente no final dos ensaios de isolamento. As Figura 36, mostra os dois tamanhos de bacilos encontrados na co-cultura em meio contendo PCP. A Figura 37 mostra as sarcinas pouco desenvolvidas juntamente com alguns bacilos também encontradas nesse mesmo material.

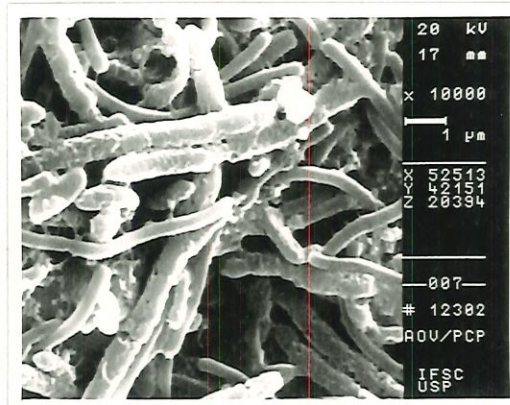


FIGURA 36

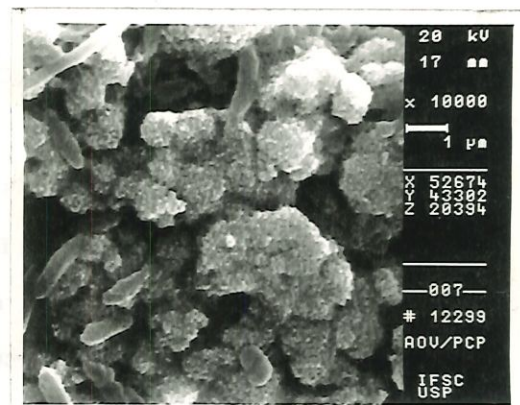


FIGURA 37

Legenda:

Figura 36 - Aspectos da co-cultura de bacilos. Ensaio de isolamento. Enriquecimento: AOV e PCP. $55\pm 2^{\circ}\text{C}$, agitação: 175rpm. Microscopia de varredura.

Figura 37 - Aspecto de alguns bacilos da co-cultura juntamente com *Methanosarcina* sp. Ensaio de isolamento. Enriquecimento: AOV e PCP, $55\pm 2^{\circ}\text{C}$, agitação: 175rpm. Microscopia de varredura.

Ao longo de todo o presente trabalho, pesquisaram-se dados a respeito de tipos microbianos termófilos relacionados com a degradação do PCP. Especificamente dentro dessas características não foram encontrados na Literatura estudos que destacassem tipos bacterianos termófilos. WU et al. (1993), referem-se a microbiologia relacionada na degradação do PCP em condições mesofílicas, observando nos grânulos a presença predominante do gênero *Methanotrix*, estando também presentes *Methanobacterium* e *Methanosarcina*. O presente trabalho também cita, na Tabela 6 do capítulo de Revisão Bibliográfica, o gênero bacteriano *Dehalobacter*, que é uma anaeróbia obrigatória, e utiliza somente compostos clorados como aceptores de elétrons, promovendo, dessa maneira, a desalogenação reductiva desses compostos (MADIGAN et al. 1997).

Os sub-cultivos de amostras (diluição 10^{-1}) em meio contendo apenas ácidos orgânicos, revelou após 11 dias de incubação, uma produção de metano de 22,15 mmoles/L, e a presença dos mesmos tipos morfológicos encontrados no enriquecimento em AOV/PCP. No entanto, nessa condição, as sarcinas apresentaram melhor desenvolvimento, verificando-se uma menor quantidade de bacilos. Após 14 dias de incubação, a diluição 10^{-1} da amostra contendo apenas AOV com uma produção de metano de 23,95 mmoles/L, certificou o favorecimento de sarcinas fluorescentes, em geral, relacionadas ao gênero *Methanosarcina*. As morfologias citadas nessa amostra são mostradas nas Figuras 38 a 41. Em relação ao desenvolvimento dos bacilos, esses tipos morfológicos não se desenvolveram muito bem nas amostras que continham AOV em relação as amostras contendo PCP, a qual apresentou um grande desenvolvimento dos bacilos. Interessantemente, após vários sub-cultivos, com um tempo de incubação de 21 dias, houve um grande desenvolvimento desses bacilos numa amostra que continha AOV e que se apresentava bastante turva através da observação a olho nu. Essa amostra pode ser vista através da Figura 42. Os comentários a cerca do trabalho pioneiro sobre o lodo granulado termófilo realizado por VAZOLLER (1995), discutidos anteriormente no âmbito desse texto, são também válidos para a condição de cultivo na ausência de etanol e PCP.

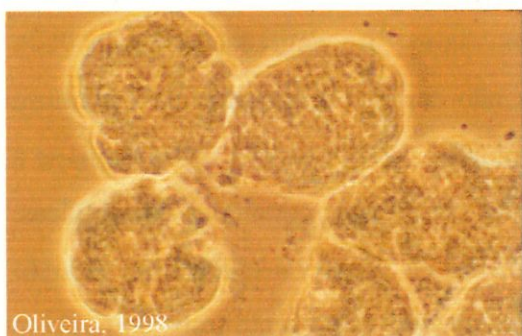


FIGURA 38

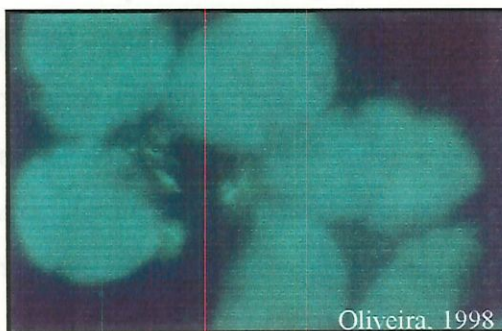


FIGURA 39

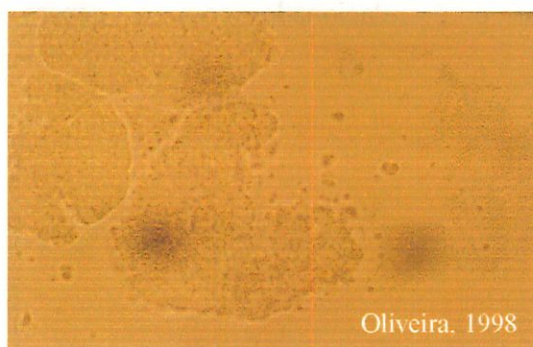


FIGURA 40

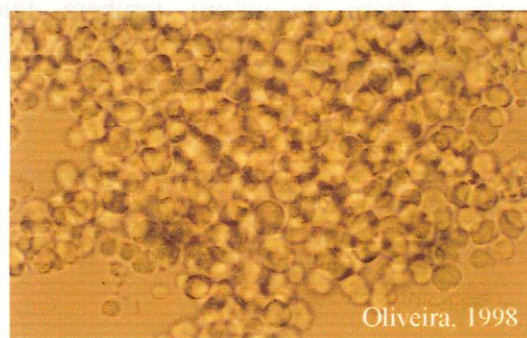


FIGURA 41

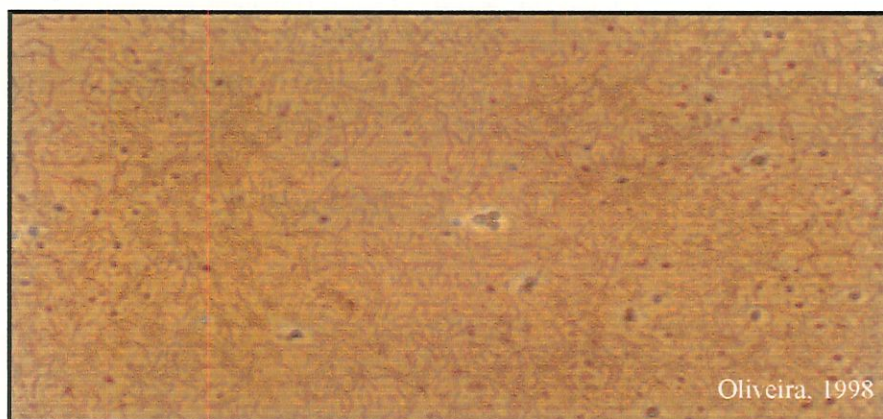


FIGURA 42

Legenda:

FIGURA 38 e 39 - Destaque das células em formato de sarcinas. Enriquecimento: AOV. Tempo de incubação: 13 dias, $55\pm 2^\circ\text{C}$, agitação: 175rpm. Microscopia de contraste de fase (Figura 39) e fluorescência (Figura 40): objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25

FIGURA 40 - Destaque das células em formato de sarcinas, rompimento das "bolsas" que contém as células. Enriquecimento: AOV. Tempo de incubação: 13 dias, $55\pm 2^\circ\text{C}$, agitação: 175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25

FIGURA 41 - Destaque das células em formato de sarcinas. Enriquecimento: AOV. Tempo de incubação: 13 dias, $55\pm 2^\circ\text{C}$, agitação: 175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25

FIGURA 42 - Aspecto dos bacilos. Enriquecimento: AOV. Tempo de incubação: 13 dias, $55\pm 2^\circ\text{C}$, agitação: 175rpm. Microscopia de contraste de fase: objetiva 100; ocular 10; zoom 1,25

A microscopia de varredura também permitiu destacar os tipos morfológicos encontrados nessas amostras contendo somente AOV. As Figuras 43 e 44 mostram a presença de células em formato de sarcinas, relacionadas ao gênero *Methanosarcina*, e a Figura 45 ilustra a co-cultura de bacilos presente nessas amostras, onde o bacilo

menor dessa co-cultura também fluoresce e é relacionado com o gênero *Methanobacterium*.

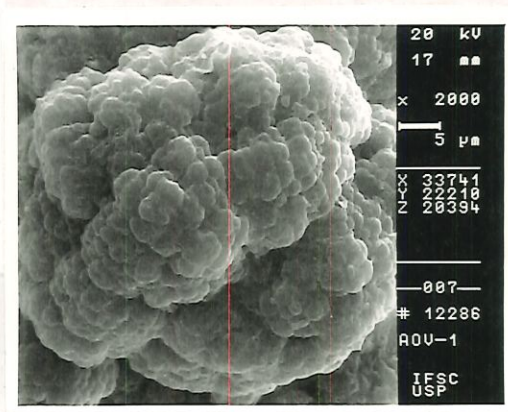
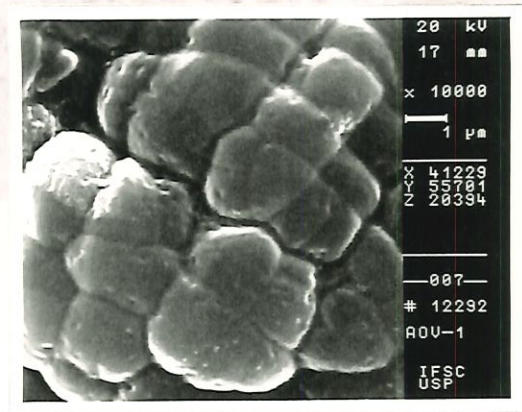


FIGURA 43

FIGURA 44

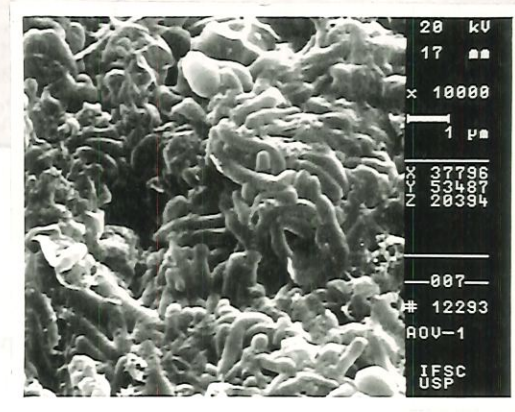


FIGURA 45

Legenda:

Figura 43 - Células em formato de sarcinas (*Methanosarcina* sp). Enriquecimento: AOV. Microscopia de varredura. Aumento de 10.000 vezes

Figura 44 - Células em formato de sarcinas (*Methanosarcina* sp) Enriquecimento: AOV. Microscopia de varredura. Aumento de 2.000 vezes

Figura 45 - Células em formato de bacilos (co-cultura). Enriquecimento: AOV. Microscopia de varredura. Aumento de 10.000 vezes

6 - CONCLUSÕES

1. O lodo anaeróbio originado de um biodigestor UASB operado com vinhaça, sob condições termofílicas, $55\pm 2^\circ\text{C}$, foi capaz de degradar o pentaclorofenol (na concentração de 2,5 mg/L), sem prévia adaptação ao composto halogenado, na presença de fontes orgânicas, ácidos orgânicos voláteis, glicose e etanol;
2. A degradação anaeróbia do PCP pelo lodo termófilo, com produção de metano foi verificada nos meios de cultivo contendo ácidos orgânicos voláteis e etanol e somente etanol;
3. Isolou-se uma co-cultura anaeróbia hábil em degradar PCP na presença de ácidos orgânicos voláteis e etanol;
4. Considerando-se os cálculos de atividade metanogênica específica obtidos no ensaio 1, verificou-se que os maiores valores foram atingidos na presença de AOV, etanol e PCP ($0,06 \text{ mmoles CH}_4/\text{gSSV.h}$) quando comparados aos valores obtidos pelos reatores controle contendo somente AOV onde o maior valor atingido foi de $0,04 \text{ mmoles CH}_4/\text{gSSV.h}$. Provavelmente, a presença do AOV e do etanol em conjunto possibilitou uma melhor interação dos grupos bacterianos no consórcio estudado em relação a produção de metano;
5. As porcentagens de remoção de PCP também se mostraram mais satisfatórias, cerca de 100%, na presença do conjunto AOV e etanol e cerca de 80% quando do emprego da glicose. Porcentagem elevada de degradação pode ser verificada quando apenas etanol e o organohalogenado estiveram presentes no meio.

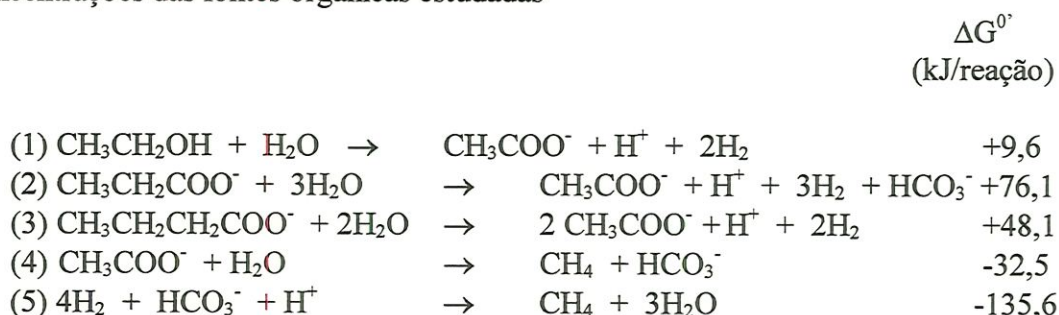
7 - RECOMENDAÇÕES

1. Estudos sobre a fisiologia do lodo anaeróbico termófilo e da co-cultura, com vistas a: verificação de outros doadores de elétrons para a degradação de PCP; faixa de concentração de PCP passível de degradação em relação ao número de microrganismos e de outros compostos orgânicos no meio; influência de compostos inorgânicos como sulfato; identificação dos microrganismos; verificação da existência de desalogenação redutiva de lodos granulados;
2. A determinação dos intermediários da degradação do PCP, inclusive isômeros, de todos os metabólitos surgidos durante a degradação do PCP até CH_4 se faz necessário para a determinação de prováveis vias metabólicas envolvidas na degradação.
3. A identificação dos possíveis microrganismos envolvidos com a degradação do PCP não foi possível até o nível de espécie. Sugere-se a utilização de ensaios bioquímicos associados a técnicas de biologia molecular para que se chegue a esse nível de classificação.

ANEXO 1
CÁLCULO TEÓRICO DE METANO

ANEXO I
CÁLCULO TEÓRICO DE METAIS

Cálculo do valor teórico de metano no “headspace” dos frascos de reação, segundo as concentrações das fontes orgânicas estudadas



[H_2 e CH_4 no estado gasoso; os demais compostos em solução aquosa a 1 mol/Kg; 25°C (Zehnder, 1988)¹].

As reações acima são dependentes da atuação de culturas de bactérias transferidoras de hidrogênio entre si, a fim de que o hidrogênio seja removido do sistema, e as reações energeticamente desfavoráveis ocorram.

Soma geral das reações de (1) a (4) para avaliação da produção teórica de CH_4 a partir dos substratos orgânicos etanol, ácidos acético, propiônico e butírico (mol) = 5 moles de CH_4 + 1 mol CH_4 a partir do Hidrogênio² produzido nas reações de (1) a (4).

Nos experimentos realizados na presente Dissertação de Mestrado, segundo as condições de ensaio, quais sejam, 20mM de ácido acético, 10 mmoles/L de ácido propiônico, 10 mmoles/L de ácido butírico e 34,25 mmoles/L de etanol, 50 mL de meio de cultivo, 200 mL de “headspace”, e considerando a estequiometria das reações a 25°C, a quantidade teórica de metano a ser produzida será de aproximadamente 26 mmoles/L.

¹A.J.B.Zehnder, Acetogenesis. Biogeochemistry of methanogenic bacteria. Biology of Anaerobic Microorganisms. 1998.872p.

² ver reação (5)

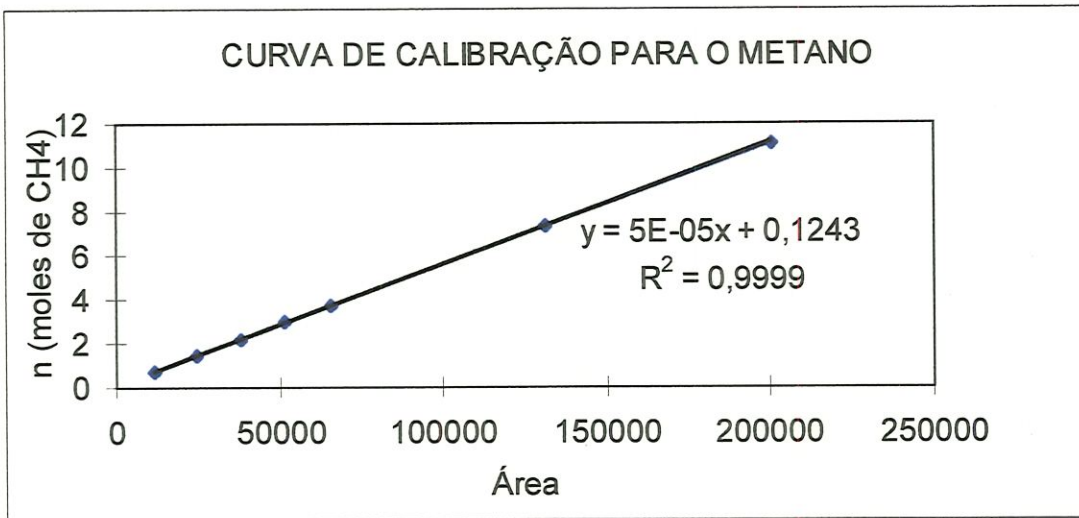


FIGURA 46 - Curva de calibração para o gás metano

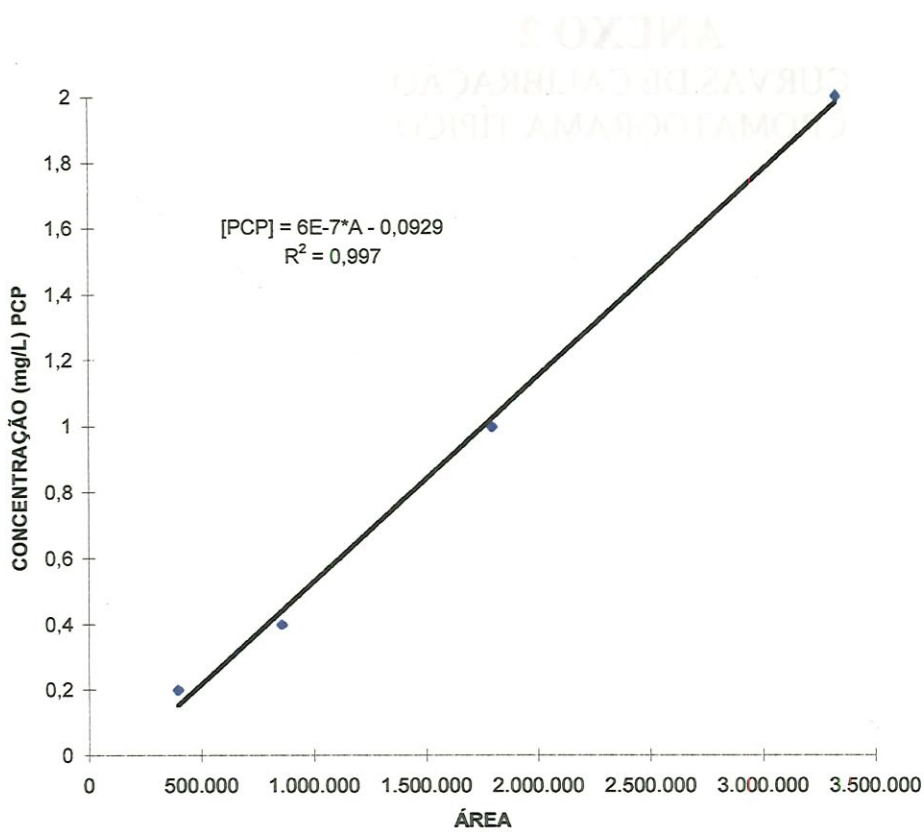


FIGURA 47 - Curva de calibração para o PCP.

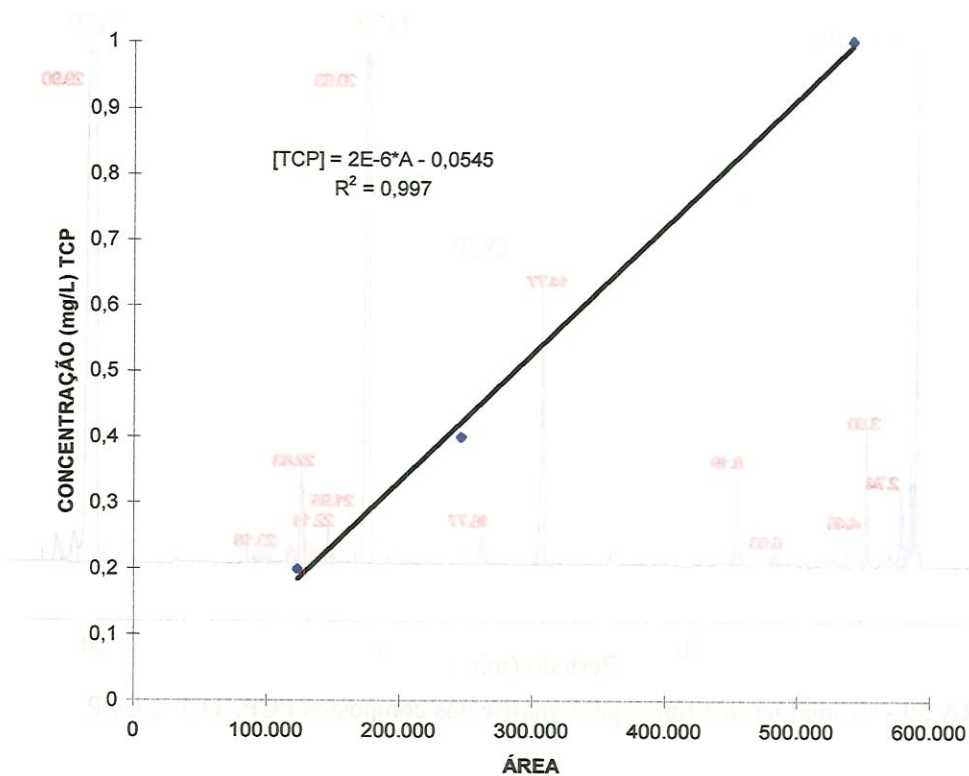


FIGURA 48 - Curva de calibração para o TCP.

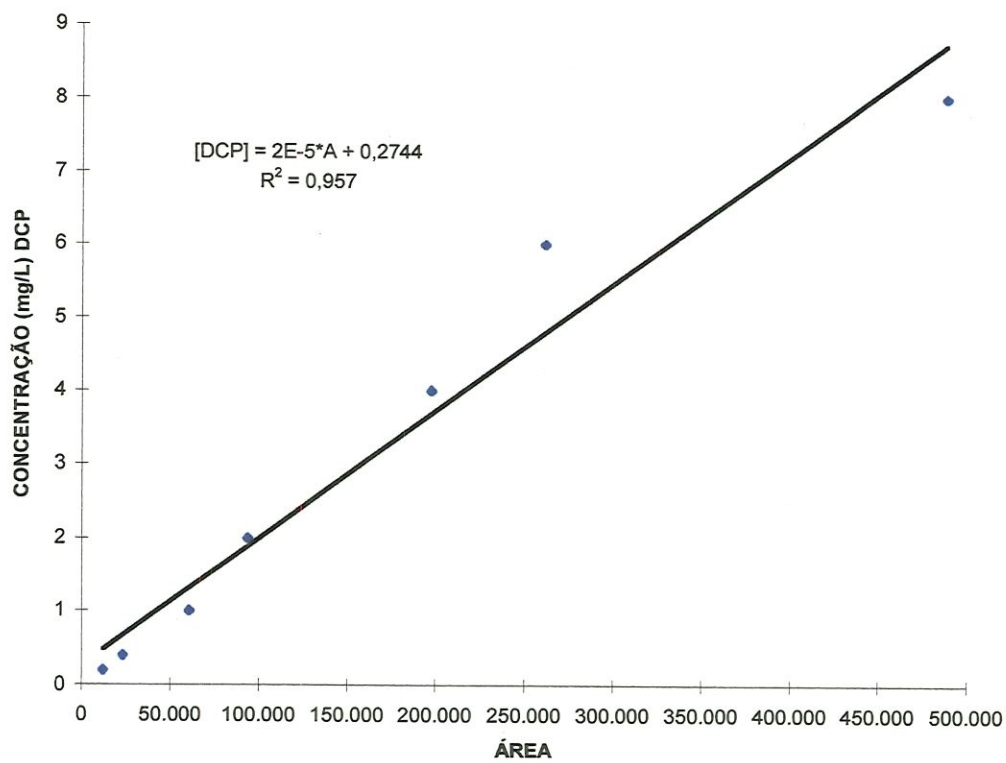


FIGURA 49 - Curva de calibração para o DCP.

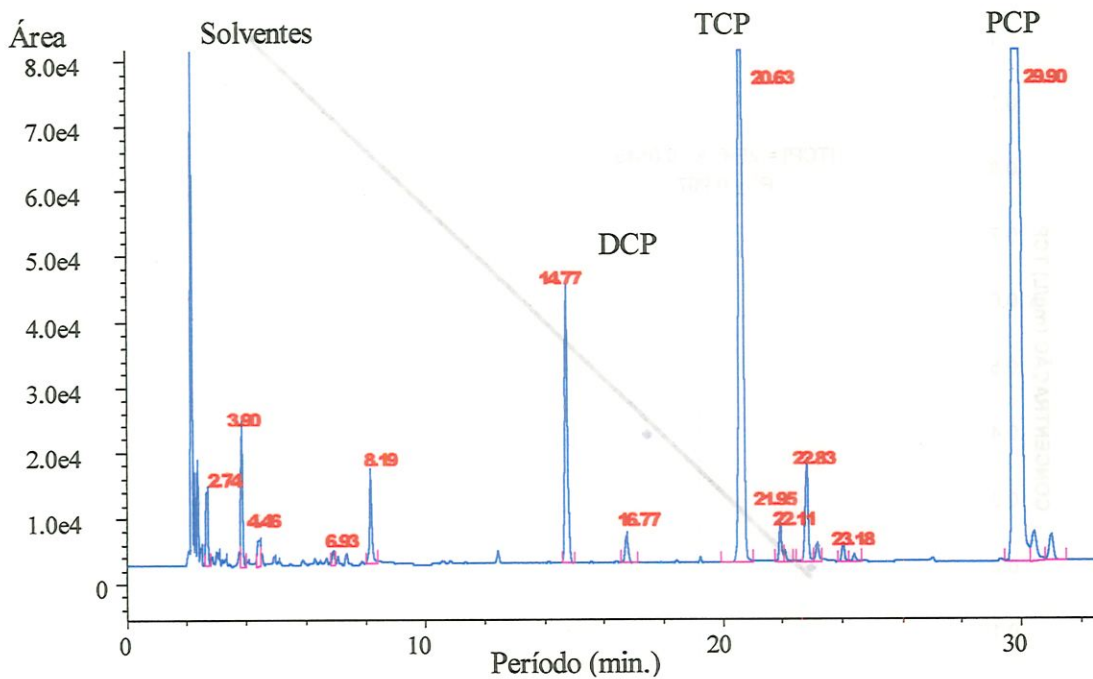


FIGURA 50 - Cromatograma típico para análise dos compostos PCP, TCP e DCP.



FIGURA 49 - Gráfico de calibração para o DCP.

ANEXO 3
PRODUÇÃO DE METANO NOS ENSAIOS DE ENRIQUECIMENTO

PROCESO DE MEJORA LOS SIGNOS DE EFECTIVIDAD EN
ANEXO 1

TABELA 35 - Produção de metano - Ensaio 1 (reator e sua réplica)

Tempo (h)	RAOV1		micromoles CH ₄ /L	mmoles CH ₄ /L _c	Cálculo final (mmoles/Lc)
	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 1	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 2			
0	0	0	0	0	0
10	0,977	0,884	1955	1955	1,955
37	2,360	2,132	4720	4721,76	4,722
65	3,818	3,494	7637	7640,99	7,641
84	4,375	4,077	8750	8757,21	8,757
91,5	4,794	0	9588	9596,35	9,596
108	5,088	4,779	10175	10179,89	10,180
115,5	5,242	5,525	10485	10494,67	10,495
159	4,709	4,509	9419	9429,27	9,429
179	3,265	3,630	6529	6538,32	6,538
188,5	3,646	3,685	7293	7299,39	7,299
201	3,257	2,468	6514	6521,53	6,522

TABELA 36 - Produção de metano - Ensaio 1 (reator e sua réplica)

Tempo (h)	RAOV2		micromoles CH ₄ /L	mmoles CH ₄ /L _c	Cálculo final (mmoles/Lc)
	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 1	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 2			
0	0	0	0	0	0
10	0,977	0,884	1954,5	1954,5	1,955
37	1,770	0,000	3539,5	3541,36	3,541
84	2,278	2,260	4556,1	4557,87	4,558
91,5	2,632	2,553	5264,3	5268,84	5,269
108	2,873	0	5745,1	5750,29	5,750
115,5	3,369	3,339	6738,4	6741,27	6,741
159	3,154	3,047	6307,8	6314,51	6,315
179	2,319	0	4638	4644,20	4,644
188,5	2,154	3,047	4307,7	4310,02	4,310
201	1,542	2,205	3084,1	3089,30	3,089

TABELA 37 - Produção de metano - Ensaio 1 (reator e sua réplica)

Tempo (h)	RAOVP3		micromoles CH ₄ /L	mmoles CH ₄ /L _c	Cálculo final (mmoles/Lc)
	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 1	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 2			
0	0	0	0	0	0
10	0,308	0,378	617	617	0,617
37	0,514	0,509	1027	1027,69	1,028
43,5	0,560	0,531	1120	1120,92	1,121
65	1,059	1,029	2119	2119,89	2,120
84	1,737	1,616	3475	3476,89	3,477
91,5	2,055	2,107	4110	4113,15	4,113
115,5	3,744	3,639	7489	7492,96	7,493
159	6,622	6,741	13245	13251,88	13,252
179	5,810	5,715	11620	11633,46	11,633
188,5	5,450	3,850	10901	10912,22	10,912
201	3,775	3,786	7549	7558,40	7,558

TABELA 38 - Produção de metano - Ensaio 1 (reator e sua réplica)

Tempo (h)	RAOVP4		micromoles CH ₄ /L	mmoles CH ₄ /L _c	Cálculo final (mmoles/Lc)
	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 1	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 2			
0	0	0	0	0	0
10	0,340	0,282	679	679	0,679
37	1,943	1,608	3886	3886,82	3,887
65	5,220	5,025	10439	10442,65	10,443
84	6,534	6,909	13069	13079,14	13,079
91,5	7,101	6,944	14203	14216,14	14,216
115,5	7,014	6,755	14028	14042,35	14,042
179	7,995	7,937	15990	16003,47	16,003
188,5	7,015	7,252	14030	14046,23	14,046
201	5,336	5,471	10671	10685,57	10,686

TABELA 39 - Produção de metano - Ensaio 1 (reator e sua réplica)

Tempo (h)	RG5		micromoles CH ₄ /L	mmoles CH ₄ /L _c	Cálculo final (mmoles/Lc)
	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 1	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 2			
0	0	0	0	0	0
10	0,228	0,225	457	457	0,457
37	0,241	0,000	483	483,25	0,483
43,5	0,233	0,205	467	467,14	0,467
65	0,199	0,204	399	399,14	0,399
91,5	0,213	0,2109	427	427,10	0,427
108	0,252	0	505	505,02	0,505
115,5	0,236	0,21945	472	471,85	0,472
137	0,206	0,2049	411	411,46	0,411
159	0,242	0	485	485,21	0,485
179	0,207	0,2014	414	413,74	0,414
188,5	0,215	0,1982	430	430,31	0,430
201	0,252	0,2088	504	504,41	0,504

TABELA 40 - Produção de metano - Ensaio 1 (reator e sua réplica)

Tempo (h)	RG6		micromoles CH ₄ /L	mmoles CH ₄ /L _c	Cálculo final (mmoles/Lc)
	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 1	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 2			
0	0	0	0	0	0
10	0,184	0,178	368	368	0,368
37	0,176	0,176	352	352,76	0,353
43,5	0,170	0,166	339	339,65	0,340
65	0,160	0,155	319	319,64	0,320
84	0,166	0,156	332	332,41	0,332
91,5	0,162	0,161	324	323,92	0,324
115,5	0,162	0,163	324	324,32	0,324
137	0,159	0,160	319	318,83	0,319
179	0,163	0,157	327	327,22	0,327
188,5	0,155	0,157	311	310,92	0,311
201	0,157	0,149	314	314,51	0,315

TABELA 41 - Produção de metano - Ensaio 1 (reator e sua réplica)

RGP7					
Tempo (h)	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 1	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 2	micromoles CH ₄ /L	mmoles CH ₄ /L _c	Cálculo final (mmoles/Lc)
0	0	0	0	0	0
10	0,271	0,248	543	543	0,543
43,5	0,239	0,229	478	478,12	0,478
65	0,228	0,213	456	456,77	0,457
91,5	0,218	0,215	437	437,24	0,437
115,5	0,205	0,210	410	410,63	0,411
137	0,210	0,213	421	421,01	0,421
179	0,199	0,206	399	399,32	0,399
188,5	0,196	0,201	392	392,81	0,393
201	0,184	0,182	367	367,50	0,367

TABELA 42 - Produção de metano - Ensaio 1 (reator e sua réplica)

RGP8					
Tempo (h)	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 1	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 2	micromoles CH ₄ /L	mmoles CH ₄ /L _c	Cálculo final (mmoles/Lc)
0	0	0	0	0	0
10	0,240	0,229	479	479	0,479
43,5	0,241	0,221	481	481,77	0,482
65	0,225	0,216	450	450,56	0,451
84	0,210	0	421	421,14	0,421
91,5	0,209	0,210	418	417,71	0,418
115,5	0,207	0,204	415	415,02	0,415
137	0,211	0,208	423	423,21	0,423
188,5	0,211	0	423	423,22	0,423
201	0,173	1069	347	346,81	0,347

TABELA 43 - Produção de metano - Ensaio 1 (reator e sua réplica)

RP9					
Tempo (h)	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 1	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 2	micromoles CH ₄ /L	mmoles CH ₄ /L _c	Cálculo final (mmoles/Lc)
0	0	0	0	0	0
10	0,196	0,193	392	392	0,392
37	0,445	0,433	890	890,49	0,890
43,5	0,637	0,526	1274	1274,78	1,275
84	1,202	1,163	2403	2404,36	2,404
108	1,493	1,452	2986	2988,76	2,989
137	1,531	1,522	3061	3064,14	3,064
179	1,425	1,431	2849	2852,15	2,852
188,5	1,392	1,365	2785	2787,46	2,787
201	1,038	1,008	2077	2079,56	2,080

TABELA 44 - Produção de metano - Ensaio 1 (reator e sua réplica)

Tempo (h)	RP10		micromoles CH ₄ /L	mmoles CH ₄ /L _c	Cálculo final (mmoles/Lc)
	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 1	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 2			
0	0	0	0	0	0
10	0,159	0,151	319	319	0,319
37	0,410	0,405	821	821	0,821
43,5	0,570	0,548	1139	1140	1,140
91,5	1,888	0	3775	3776	3,776
137	2,172	2,105	4345	4347	4,347
179	2,354	2,328	4708	4712	4,712
188,5	2,263	2,139	4525	4530	4,530
201	1,970	1,984	3939	3944	3,944

TABELA 45 - Produção de metano - Ensaio 2 (reator e sua réplica)

Tempo (h)	RAOVPI		micromoles CH ₄ /L	mmoles CH ₄ /L _c	Cálculo final (mmoles/Lc)
	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 1	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 2			
0	0	0	0	0	0
14,5	0,667	0,634	1334	1334	1,334
17,5	1,107	1,124	2215	2215,80	2,216
35,5	3,493	3,283	6985	6987,33	6,987
38,5	4,324	4,150	8649	8655,28	8,655
62,5	6,247	0	12493	12501,67	12,502
78,0	6,441	0	12881	12887,25	12,887
127,5	6,434	6,315	12867	12873,64	12,874

TABELA 46 - Produção de metano - Ensaio 2 (reator e sua réplica)

Tempo (h)	RAOV2		micromoles CH ₄ /L	mmoles CH ₄ /L _c	Cálculo final (mmoles/Lc)
	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 1	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 2			
0	0	0	0	0	0
14,5	0,287	0,287	573	573	0,573
17,5	0,410	0,415	820	820,87	0,821
35,5	1,073	1,055	2146	2146,82	2,147
38,5	1,364	1,394	2727	2729,23	2,729
57,5	3,536	3,624	7072	7074,86	7,075
62,5	4,256	4,251	8511	8518,36	8,518
78,0	5,713	0	11427	11435,11	11,435
103,5	6,369	6,172	12737	12742,71	12,743
127,5	5,510	5,549	11019	11031,94	11,032

TABELA 47 - Produção de metano - Ensaio 2 (reator e sua réplica)

Tempo (h)	RAOV3		micromoles CH ₄ /L	mmoles CH ₄ /L _c	Cálculo final (mmoles/Lc)
	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 1	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 2			
0,0	0	0	0	0	0
14,5	0,4964	0,50265	993	993	0,993

17,5	0,63615	0,59575	1272	1273,30	1,273
35,5	0,75345	0,7364	1507	1508,13	1,508
38,5	0,82215	0,78695	1644	1645,79	1,646
57,5	1,03795	1,0313	2076	2077,51	2,078
62,5	1,0227	1,0152	2045	2047,47	2,047
78,0	1,21625	1,3093	2433	2434,54	2,435
79,5	1,31515	1,2987	2630	2632,83	2,633
103,5	2,17915	2,2042	4358	4360,91	4,361
127,5	2,7719	2,7779	5544	5548,18	5,548
152,0	8,1232	8,0755	16246	16251,95	16,252

TABELA 48 - Produção de metano - Ensaio 2 (reator e sua réplica)

Tempo (h)	RAOV4		micromoles CH4/L	mmoles CH4/Lc	Cálculo final (mmoles/Lc)
	micromoles CH4/0,5 mL Amostra 1	micromoles CH4/0,5 mL Amostra 2			
0	0	0	0	0	0
14,5	0,600	0,615	1200	1200	1,200
17,5	0,868	0,855	1736	1736,91	1,737
35,5	1,775	0	3550	3551,42	3,551
38,5	2,127	2,128	4253	4254,77	4,255
57,5	4,138	4,129	8276	8279,85	8,280
62,5	4,252	4,168	8504	8512,07	8,512
78,0	4,834	0,000	9668	9676,02	9,676
103,5	4,000	4,044	7999	8004,03	8,004
127,5	3,648	3,7655	7295,7	7303,74	7,304

TABELA 49 - Produção de metano - Ensaio 2 (reator e sua réplica)

Tempo (h)	RP5		micromoles CH4/L	mmoles CH4/Lc	Cálculo final (mmoles/Lc)
	micromoles CH4/0,5 mL Amostra 1	micromoles CH4/0,5 mL Amostra 2			
0	0	0	0	0	0
14,5	0,296	0,277	593	593	0,593
17,5	0,477	0,452	954	954,07	0,954
35,5	1,480	1,485	2960	2961,23	2,961
38,5	1,747	1,793	3493	3496,17	3,496
57,5	1,858	1,898	3716	3719,54	3,720
62,5	1,809	1,731	3617	3620,86	3,621
78,0	1,887	1,810	3774	3777,44	3,777
103,5	1,784	1,788	3568	3571,50	3,571
127,5	1,656	1,642	3312	3315,27	3,315

TABELA 50 - Produção de metano - Ensaio 2 (reator e sua réplica)

Tempo (h)	RP6		micromoles CH4/L	mmoles CH4/Lc	Cálculo final (mmoles/Lc)
	micromoles CH4/0,5 mL Amostra 1	micromoles CH4/0,5 mL Amostra 2			
0	0	0	0	0	0
14,5	0,334	0,344	667	667	0,667
17,5	0,524	0,536	1047	1047,68	1,048
35,5	1,649	1,675	3297	3298,06	3,298
38,5	1,872	1,823	3744	3747,62	3,748
57,5	1,958	1,975	3916	3919,80	3,920
62,5	1,790	1,748	3579	3582,93	3,583

78,0	1,793	1,732	3586	3589,74	3,590
79,5	1,659	1,673	3317	3320,72	3,321
103,5	1,555	1,541	3110	3113,43	3,113
127,5	1,396	1,359	2792	2795,20	2,795
152,0	2,937	0	5874	5877,16	5,877

TABELA 51 - Produção de metano - Ensaio 3 (reator e sua réplica)

Tempo (h)	RAOVPI		micromoles CH ₄ /L	mmoles CH ₄ /Lc	Cálculo final (mmoles/Lc)
	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 1	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 2			
0	0	0	0	0	0
6	0,175	0,197	350	350	0,350
23	0,568	0,479	1137	1136,87	1,137
28,5	0,905	0,876	1810	1811,45	1,811
49	1,150	0,000	2300	2301,88	2,302
68,5	1,751	1,741	3501	3502,55	3,503
77	1,849	1,823	3697	3700,69	3,701
100	3,047	2,069	6095	6098,37	6,098
123	5,715	0,000	11431	11435,92	11,436
150	5,590	5,422	11180	11185,32	11,185
169,5	6,365	6,190	12730	12740,71	12,741
173,5	6,589	6,788	13178	13190,86	13,191
189	7,815	7,730	15629	15642,78	15,643
196	7,743	7,902	15487	15502,34	15,502
214,5	6,861	7,169	13723	13738,45	13,738
219,5	7,019	6,949	14037	14051,23	14,051
244	7,006	6,792	14011	14025,17	14,025
270,5	6,278	6,265	12557	12570,60	12,571
294,5	6,590	6,383	13180	13192,04	13,192
318	6,594	0,000	13187	13200,27	13,200
332	6,125	6,070	12250	12256,39	12,256
358	6,280	6,021	12560	12572,10	12,572
365	5,902	0,000	11804	11816,00	11,816
383	6,065	5,812	12130	12135,60	12,136
389	6,025	5,877	12050	12061,98	12,062
437	5,515	5,892	11031	11042,70	11,043
463,5	5,102	5,144	10205	10216,31	10,216

TABELA 52 - Produção de metano - Ensaio 3 (reator e sua réplica)

Tempo (h)	RAOV2		micromoles CH ₄ /L	mmoles CH ₄ /Lc	Cálculo final (mmoles/Lc)
	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 1	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 2			
0	0	0	0	0	0
6	0,166	0,151	331	331	0,331
23	0,316	0,296	631	631,42	0,631
28,5	0,407	0,379	814	814,31	0,814
49	1,338	0,855	2677	2677,69	2,678
68,5	2,200	2,231	4400	4402,29	4,402
77	2,194	2,201	4389	4393,33	4,393
100	2,165	2,164	4330	4334,70	4,335

143,5	2.010	0	4019	4023,43	4.023
150	2.263	2.263	4526	4528,11	4.528
169,5	1,991	2,002	3983	3987,13	3,987
173,5	1,942	2,019	3885	3888,59	3,889
189	2.063	1.984	4127	4130,66	4,131
196	1.880	1.918	3760	3764,15	3,764
214,5	1,836	1,845	3673	3676,70	3,677
219,5	1,888	1,858	3776	3779,18	3,779
244	2.060	2,033	4120	4123,85	4,124
270,5	2,192	2,147	4384	4387,89	4,388
294,5	2,544	2,529	5088	5092,74	5,093
318	2,930	2,970	5861	5865,97	5,866
332	3,502	3,513	7005	7010,60	7,011
358	4,249	4,349	8497	8504,02	8,504
365	4,291	4,360	8582	8591,00	8,591
383	5,171	5,249	10342	10350,75	10,351
389	5,664	5,493	11329	11338,92	11,339
417	6,200	6,308	12400	12410,96	12,411
437	7,397	7,379	14794	14806,41	14,806
452,5	8,302	8,014	16603	16618,08	16,618
463,5	7,677	7,751	15353	15369,42	15,369

TABELA 53 - Produção de metano - Ensaio 3 (reator e sua réplica)

Tempo (h)	RAOV3		micromoles CH4/L	mmoles CH4/Lc	Cálculo final (mmoles/Lc)
	micromoles CH4/0,5 mL Amostra 1	micromoles CH4/0,5 mL Amostra 2			
0	0	0	0	0	0
6	0,194	0,156	388	388	0,388
23	0,517	0,513	1033	1033,45	1,033
28,5	0,672	0,669	1345	1345,93	1,346
49	1,551	1,380	3101	3102,64	3,103
68,5	3,699	3,742	7398	7400,73	7,401
77	4,201	4,203	8402	8409,64	8,410
100	4,756	4,730	9512	9520,10	9,520
150	5,132	5,118	10263	10272,69	10,273
169,5	4,889	4,793	9779	9789,05	9,789
173,5	4,898	0	9795	9804,68	9,805
189	5,010	0	10020	10025,20	10,025
214,5	4,801	0	9603	9607,61	9,608
219,5	4,866	4,868	9732	9736,40	9,736
244	5,719	5,691	11437	11446,83	11,447
270,5	6,048	6,137	12096	12107,01	12,107
294,5	7,019	6,866	14038	14050,28	14,050
318	7,191	7,265	14381	14395,19	14,395
332	7,633	0,000	15266	15280,16	15,280
358	7,435	6,916	14869	14876,93	14,877
383	7,215	6,942	14429	14443,65	14,444
389	7,031	6,915	14061	14075,36	14,075
437	7,099	6,908	14199	14212,85	14,213
452,5	6,993	6,541	13986	13999,61	14,000
463,5	6,456	6,463	12913	12926,03	12,926

TABELA 54 - Produção de metano - Ensaio 3 (reator e sua réplica)

Tempo (h)	RAOVSO ₄ ⁻²		micromoles CH ₄ /L	mmoles CH ₄ /Lc	Cálculo final (mmoles/Lc)
	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 1	micromoles CH ₄ /0,5 mL Amostra 2			
0	0	0	0	0	0
6	0,184	0,198	369	369	0,369
23	0,476	0,502	952	952,58	0,953
28,5	0,611	0,597	1222	1222,78	1,223
49	1,299	0	2599	2600,11	2,600
68,5	2,720	2,751	5440	5441,20	5,441
77	3,075	3,045	6151	6155,97	6,156
100	3,756	3,644	7511	7517,42	7,517
143,5	3,811	0	7621	7628,80	7,629
189	4,194	4,246	8389	8392,61	8,393
244	4,426	4,364	8852	8860,54	8,861
270,5	4,372	4,732	8743	8751,89	8,752
288,5	4,546	0	9091	9100,10	9,100
311	4,639	0	9277	9281,75	9,282
341	4,890	0	9779	9783,64	9,784
365	5,412	5,419	10825	10829,39	10,829
383	5,732	5,726	11465	11475,33	11,475
389	5,938	0,000	11876	11887,46	11,887
417	6,022	5,772	12045	12050,44	12,050
437	6,297	0	12594	12606,19	12,606
452,5	6,405	6,040	12811	12817,00	12,817
463,5	6,082	6,155	12165	12177,25	12,177

Referências Bibliográficas

AHRING, B.K. (1991). Methanogenesis during thermophilic anaerobic digestion with focus on acetato. Proc. Int. Sym. Environ. Biotechnol., v.I, p. 275-283.

AHRING, B.K. (1994). Status on science and application of thermophilic anaerobic digestion. Wat. Sci. Tech., v.30, n.12, p.241-249.

AHRING, B.K.; ANGELIDAKI, I.; JOHANSEN, K. (1992). Anaerobic treatment of manure together with industrial waste. Water Science Technology, v.25, n.7, p. 311-318.

AHRING, B.K.; WESTERMAN, P. (1987). Thermophilic anaerobic degradation of butyrate by a butyrate-utilizing bacterium in coculture and triculture with methanogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol., v. 53, n. 2, p.429-433.

ANTRANIKIAN, G. (1990). Physiology and enzymology of thermophilic anaerobic bacteria degrading starch. FEMS Microbiology Reviews, v.75, p.201-218.

ARAÚJO, J.C. (1995). Caracterização e evolução do biofilme em reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com esgoto sanitário sintético. São Carlos. 158p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo.

ARAÚJO, J.C.; CAMPOS, J.R.; VAZOLLER, R.F. (1998). Methanogenic biofilm: structure and microbial population activity in na anaerobic bed reactor treating synthetic wastewater. Journal Water Pollution Control Federation, submitted.

BALCH, W.E.; FOX, G.E.; MAGRUM, J.L.; WOESE, C.R.; WOLFE, R.S. (1977). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. Microbiological Reviews, v.43, p.260-296.

BANERJI, S.K. & BAJPAI, R.K. (1994). Cometabolism of pentachlorophenol by microbial species. Journal of Hazardous Materials, v.39, p.19-31.

BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY (1988). Archaea. 1ª. ed. (Eds) J.T. Stanley, M.P. Bryant, N. Pfenning, J.G. Holf. Baltimore, Williams & Wilkins, v.3.

BHATNAGAR, L. & FATHEPURE, B.Z. (1991). Mixed cultures in detoxification of hazardous waste. Mixed cultures in Biotechnology - Environmental Biotechnology. (Eds). G. Zeikus & E. A. Johnson. Capítulo 11, p.293-340.

BOYD, S.A. & SHELTON, D.R. (1984). Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. Applied and Environ. Microbiol., Washington, v.47, n.2, p.272-277.

BROCK, T.D. (1986). Introduction: an a overview of the thermophiles. In: THERMOPHILES: General, molecular and applied microbiology. Ed. T.D. Brock. John Wiley & Sons, Inc., EUA, p. 1-16.

BRYANT, M.P. (1972). Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. The American Journal of Clinical Nutrition, v.25, p.1324-1328.

CHAUDHRY, G.R.; CHAPALAMADUGU, S. (1991) Biodegradation of halogenated organic compounds. Microbiological Reviews, v.55, n.1.

CHRISTIANSEN, N. & AHRING, B.K. (1996). Introduction of a de novo bioremediation activity into anaerobic granular sludge using the dechlorinating bacterium DCB-2. Antonie van Leeuwenhoek, v.69, p.61-66.

COMITÊ DE EFLUENTES DA ABTCP (1993). Organoclorados em fábricas de celulose. In: O papel, n.7.

CRAVEIRO, M. (1994). Desempenho e estudos cinéticos de biodigestores híbridos com diferentes porcentagens de enchimento. São Paulo. 246p. Tese de Doutorado da Escola de Engenharia Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo.

DAMIANOVIC, M.H.R.Z. (1997). Degradação de pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RHALF). São Carlos. 174p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

DODDEMA, H.J.; VOGELS, G. (1978). Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. Appl. Environ. Microbiol., v.36, p.752-754.

DOLFING, J & TIEDJE, J.M. (1986). Hydrogen cycling in a three-tiered food web growing on the methanogenic conversion of 3-chlorobenzoate. FEMS Microbiol. Ecol., v.38, p. 293-298.

DSM - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH-DSM. Curso: Scientific services of culture collections - The DSM experience. Fundação Tropical de Pesquisas "André Tosello". Campinas, SP, 1991.

DUBOURGUIER, H.C. (1987). Curso Ecologia da Digestão Anaeróbia. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo, CETESB, São Paulo.

FIELD, J.A.; STAMS, A.J.M.; KATO.M.; SCHRAA, G. (1995). Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. Antonie van Leeuwenhoek, v.67, p.47-77.

FORESTI, E. (1994). Fundamentos do processo de digestão anaeróbia. In: TRATAMIENTO anaeróbio. Montividéo, Uruguai, p.97-110.

GIBSON, S.A; SUFLITA, J.M. (1990). Anaerobic degradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in samples from a methanogenic aquifer: stimulation

by short-chain organic acids and alcohols. Appl. Environ. Microbiol., v.56, p.1825-1832.

HAGGBLOM, M.M.; VALO, R.J. (1995). Bioremediation of chlorophenol wastes. In: CERNIGLIA, C.E. & YOUNG, L.Y., (Eds.) Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals, ed. Wiley-Liss. New York. Cap. 11, p.389-434.

HENDRIKSEN, H.V.; LARSEN, S.; AHRING, B.K. (1992). Influence of a supplemental carbon source on anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in granular sludge. Appl Environ Microbiol. V 58, p. 365-370.

HOLLIGER, C.; STAMS, A.J.M.; ZEHNDER, A.J.B (1988). Anaerobic degradation of recalcitrant compounds. In Anaerobic Digestion. (Eds.) E.r. Hall and P.N. Hobison. Pergamon Press, New York, p. 211-224.

HOLLIGER, C.J. & SCHUMACHER W. (1994). Reductive dehalogenation as a respiratory process. Antonie van Leeuwenhoek, v.66, p.239-246.

HORVATH, R.S. (1972). Microbial co-metabolism and degradation of organic compounds in nature. Bact. Rev. v.36, p.146-155.

HUNGATE, R.E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: METHODS in microbiology. Eds. J. R. Norris, D.W. Ribbons. New York: Academic, New York, EUA, v.38, p.117-132.

JANSSEN, D.B. & KONING, W. (1995). Development and application of bacterial cultures for the removal of chlorinated aliphatics. Wat. Sci. Tech., v..31, n.1, p.237-247.

KELLY, R.M.; DEMING, J.W. (1988). Extremely thermophilic Archaeobacteria: Biological and engineering considerations. Biotechnology Progress, v.4, p.47-62.

- KENNES, C.; WU, W.M.; BHATNAGAR, L.; ZEIKUS, J.G. (1996). Anaerobic dechlorination and mineralization of pentachlorophenol and 2,4,6-trichlorophenol by methanogenic pentachlorophenol-degrading granules. Appl. Microbiol Biotechnol, v.44, p.801-806.
- KOHRING, G.W.; ZHANG, X.; WIEGEL, J. (1989). Anaerobic dechlorination of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments in the presence of sulfate. Appl. and Environ. Microbiol., Washington, v.55, p.2735-2737.
- LANGWORTHY, T. & POND, J. (1986). Membranes and lipids of thermophiles. In: THERMOPHILES: General, molecular and applied microbiology. Ed. T.D. Brock. John Wiley & Sons, Inc., EUA, p.107-135.
- LARIZZATI, S.F. (1997). Avaliação da degradação anaeróbia do pentaclorofenol por consórcios metanogênicos enriquecidos. São Carlos. 138p. Tese (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- LARSEN, S; HENDRIKSEN, H.V.; AHRING, B.K. (1991). Potential for Thermophilic (50°C) Anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in different ecosystems. Appl. Environ. Microbiol., p.2085--2090.
- McALLISTER, K.A.; LEE, H.; TREVORS, J.T. (1996). Microbial degradation of pentachlorophenol. Biodegradation, v.7, p.1-40.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. (1997). In: Brock Biology of microorganisms. 8a. ed., New Jersey, Prentice Hall, EUA, , p.1-986.
- MIKESSEL, M.D. & BOYD, S.A. (1986). Complete reductive dechlorination and mineralization of pentachlorophenol by anaerobic microorganisms. Applied and Environ. Microbiol., v. 52, n.4, p. 861-865.

- MOHN, W.W. & KENNEDY, K.J. (1992). Reductive dehalogenation of chlorophenols by *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. Appl Environ Microbiol., v.58, p.1367-1370.
- MOHN, W.W. & TIEDJEI, J.M. (1992). Microbial reductive dehalogenation. Microbial Reviews, v.56, n.3, p.482-507.
- NICHOLSON, D.K.; WOODS, S.L.; ISTOK, J.D.; PEEK, D.C.N (1992). Reductive dechlorination of chlorophenols by a pentachlorophenol-acclimated methanogenic consortium. Appl Environ Microbiol., v.58, p. 2280-2286.
- REINEKE, W.; KNACKMUSS, H.J. (1988). Microbial degradation of haloaromatics. Annuary Reviews Microbiology, n.42, p.263-287.
- RUSSEL, N.J.; FUKUNAGA, N. (1990). A comperasion of thermal adaptation of membrana lipids in pscrophilic and thermophilic bacteria. FEMS Microbiology Reviews, v.75, p.171-182.
- STAMS, A.J.M. (1994). Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. Antonie van Leeuwenhoek, v.66, p.271-294.
- SHELTON, D.R. & TIEDJE, J.M. (1984). Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. Appl. Environ. Microbiol., v.48, p.23-30.
- SOUZA, M.E. ; FUZARO, G.; POLEGATO, A.R. (1991). Thermophilic anaerobic digestion of vinasse in pilot plant UASB reactor. In: Proceedings of Sixth International Symposium on Anaerobic Digestion, São Paulo, Brasil, p.191-200.
- STEIERT, J.G.; PIGNATELLO, J.J.; CRAWFORD, R.L. (1987). Degradation of chlorinated phenols by a pentachlorophenol-degrading bacterium. Appl. Environ. Microbiol., p.907-910.

- STEVENS, T.O., LINKFIELD, T.G., TIEDJE, J.M. (1988). Physiological Characterization of Strain DCB-1, a unique dehalogenating sulfidogenic bacterium. Applied and Environmental Microbiology, v.54, n.12, p. 2938-2943.
- SUFLITA, J.M.; TOWNSEND, G.T. (1995). The microbial ecology and physiology and aryl dehalogenation reactions and implications for bioremediation. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. CERNIGLIA, C.E. & YOUNG, L.Y., (Eds.), Wiley-Liss. New York. Cap. 5, p. 243-268.
- SUNDARAM, T.K. (1986). Physiology and growth of thermophilic bacteria. In: THERMOPHILES: General, molecular and applied microbiology. Ed. T.D. Brock. John Wiley & Sons, Inc., EUA. p.75-105.
- van LIER, J.B.; MARTIN, J.L.S.; LETTINGA, G. (1996). Effect of temperature on the anaerobic thermophilic conversion of volatile acids by dispersed and granular sludge. Wat. Res., v.30, n.1, p.199-207.
- VAZOLLER, R.F. (1994). Microbiologia da Digestão Anaeróbia Termofílica. In: Tratamiento Anaerobio. III Taller y Seminario Latinoamericano Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales. p 29-40.
- VAZOLLER, R.F. (1995). Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos, 259p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.
- VENKATARAMANI & AHLERTT, R.C. (1985). Role of cometabolism in biological oxidation of synthetic compounds. Biotechnology and Bioengineering, v.27, p.1306-1311.
- WESTERMANN, P.; AHRING, B.K.; MAH, R.A. (1989). Threshold acetate concentrations for acetate catabolism by acetate catabolic methanogenic bacteria. Applied Environmental Microbiology, v.55, p. 514-515.

- WIEGEL, J. (1986). Methods for isolation and study of thermophiles. In: THERMOPHILES: General, molecular and applied microbiology. Ed. T.D. Brock. John Wiley & Sons, Inc., EUA, p.17-37.
- WIEGEL, J. (1990). Temperature spans for growth: hypothesis and discussion. FEMS Microbiology Reviews, v.75, p.155-170.
- WILD, S.R.; HARRAD, S.J.; JONES, K.C. (1993). Chlorophenols in digested U.K. sewage sludge. Water Research, v.27, n.10, p.1527-1534.
- WU, W.M.; BHATNAGAR, L.; ZEIKUS, J.G. (1993). Performance of anaerobic granules for degradation of pentachlorophenol. Appl. and Environ. Microbiology, Washington, v.59, n.2, p.389-397.
- WU, W.M.; NYE, R.F.H.; BHATNAGAR, L. (1992). Anaerobic granules developed for reductive dechlorination of chlorophenols and chlorinated ethylene. Trabalho datilografado 28p..
- YAMAGUCHI, M.; HAKE, J.; TANIMOTO, Y.; NARITOMI, T.; OKAMURA, K.; MINAMI, K. (1991). Enzyme activity for monitoring the stability in a thermophilic anaerobic digestion of wastewater containing methanol. Journal of fermentation and bioengineering, v.4, p.264-269.
- ZINDER, S.H.; KOCH, M. (1984). Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. Archives of Microbiology, v.138, p.263-272.
- ZINDER, S.H. (1990). Conversion of acetic acid to methane by thermophiles. FEMS Microbiology Reviews, v.75, p.125-138.

APÊNDICE

ALFINDICE

OBSERVAÇÃO: Reprodução na íntegra das informações do caso RHODIA S/A. Não é responsabilidade da autora da presente dissertação de Mestrado.

CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL CAUSADA PELA RHODIA

HISTÓRICO - CUBATÃO / INDÚSTRIAS.

Cubatão é um pequeno município, com 148 km² de extensão, em espaço geográfico formado por 57% de Serras, 25% de Mangues e 18% de planícies e mangues aterrados.

Sobre esta área mínima - 26 Km² - dentro de limites da mata atlântica e de manguezais - ecossistemas extremamente biodiversificados e frágeis - construiu-se o maior pólo petroquímico e siderúrgico do País.

Na década de 50 implanta-se a primeira refinaria da PETROBRÁS - a Refinaria Presidente Bernardes de Cubatão. Em 1965 entra em funcionamento a Companhia Siderúrgica Paulista - COSIPA. Na década de 70 cresceu a indústria petroquímica e de fertilizantes. No total, são 23 indústrias de ponta, nove das quais de produtos químicos, como a RHODIA S/A, transnacional do grupo RHÔNE-POULENC, e sete indústrias de fertilizantes.

Este pólo industrial foi um dos pilares mais importantes para o modelo de desenvolvimento estabelecido pelo regime militar que então dominava o poder nacional no seu estágio mais arbitrário e ditatorial dos 20 anos de ditadura militar iniciado em 1964.

Cubatão era área de Segurança Nacional, comandada e administrada por militares que para promover o então chamado "milagre econômico" permitiram a transgressão de qualquer lei ou direito - dos direitos humanos ao direito ambiental.

A degradação da liberdade e da cidadania foi simultânea à degradação devastadora do meio ambiente social e da natureza.

A supressão da lei garantiu a impunidade absoluta e prenunciou o "Vale da Morte" no qual Cubatão seria transformada pelas multinacionais como a RHÔNE-POULENC.

CLOGIL - RHODIA

Em 1965 foi constituída a CLOGIL S.A. - Indústrias Químicas, dividida em partes iguais pela PROGIL - Socyeté Anonyme (Paris - França) e pela CARBOCLORO S.A - Indústrias Químicas (São Paulo/Brasil) - da Multinacional OCIDENTAL CHEMICAL (Cleveland - OHIO/EUA). Em 1969 a CARBOCLORO vende suas ações para a COLORES HOLDING (Bale, Suíça).

Em 1966 entra em operação a unidade fabril da CLOGIL em Cubatão, estado de São Paulo, voltada à produção de solventes e fungicidas clorados, com a produção de 950 toneladas/ano. O processo produtivo liberava cerca de 2.6 toneladas/dia de resíduos tóxicos.

O Pentaclorofenol foi usado largamente, principalmente pela indústria madeireira.

Em 1971 inicia-se o processo de instalação de uma nova unidade sob responsabilidade industrial da RHÔNE-PROGIL. Em 1974 começa a produção de

5.400 toneladas/ano de Tetracloreto de Carbono (CCl_4), 3.600 toneladas/ano de Percloroetileno (C_2Cl_4) e 26.000 toneladas/ano de Ácido Clorídrico, gerando mais de 500 toneladas/ano de resíduos tóxicos, principalmente hexaclorobenzeno (HCB) e hexaclorobutadieno (HCBD).

Além do HCB e do HCBD a produção gerava outros resíduos como o Tetraclorobenzeno, o Clorofórmio, o Tricloroetileno, etc.

Estes resíduos, em torno de 53 toneladas/mês, foram lançados clandestinamente numa vala localizada nos fundos da área fabril, especialmente escavada para este fim, e que suportou o descarte de 5.000 toneladas.

Preenchida a vala inicial o lixo residual era descartado aleatoriamente na área fabril ociosa até atingir o volume assombroso de 15 mil toneladas.

De 1976 à 1978 as duas fábricas operavam à plena capacidade.

A primeira, a de "penta" - Pentaclorofenato de Sódio .

A segunda, a "tetra-per" - Tetracloreto de Carbono e Percloroetileno.

Ambas causando danos irreversíveis à saúde dos trabalhadores.

Ambas despejando continuamente um volume cada vez maior de resíduos na área da fábrica.

Atingindo os limites da área da fábrica para o lançamento dos resíduos, a Rhodia passou a despejá-los criminosamente por áreas escolhidas no entorno dos municípios da região.



Foto 1 - Gleba do Quarentenário em São Vicente: 1 dos 11 "lixões químicos" (depósitos clandestinos) da Rhodia já descobertos na Baixada Santista.

UNIDADE QUÍMICA CUBATÃO - RHODIA

A unidade fabril localizada em Cubatão/São Paulo, gerou de 1966 a 1975 sob o nome CLOGIL e a partir de 1975 sob o nome RHODIA resíduos tóxicos, e desenvolveu em todas as fases de suas operações atividades agressivas à saúde de seus funcionários.

De 1966 a 1978 a unidade de Cubatão produziu PENTAFLOROFENOL (C_6Cl_5OH), suspendendo-se sua fabricação no mesmo ano em que vieram a público as denúncias de mortes de trabalhadores causadas por intoxicação com o produto.

No entanto, apenas em 1978 a sociedade tomou conhecimento das intoxicações dos trabalhadores que já vinham ocorrendo desde 1966. Alguns

trabalhadores relatam que desde os primeiros dias de trabalho já sentiam os sintomas: dores de cabeça, tontura e ardência da garganta e nariz eram os mais comuns. Com o passar dos meses os sintomas iam se agravando: manchas escuras na pele, alterações hepáticas e no sistema nervoso. Muitos apresentavam hepatite crônica e feridas purulentas por todo o corpo, posteriormente identificadas como cloracnes.

Com a notícia da morte de um funcionário da RHODIA, causada por cirrose hepática provocada pelo pentaclorofenol, os demais operários passaram a se organizar para reivindicar da empresa garantia de emprego, e tratamento médico especializado. Foi grande a resistência por parte da empresa em assumir a responsabilidade pelos danos causados à saúde de seus funcionários. Somente em 20 de março de 1986 a RHODIA atende as reivindicações através de uma carta assinada na Delegacia Regional do Trabalho.

Muitos desses trabalhadores ainda são funcionários da área administrativa da RHODIA/CUBATÃO. Com bom humor, os operários contam que só conseguiram vêr atendidas suas reivindicações quando um dos colegas, desesperado com seu estado de saúde e cansado da insensibilidade da empresa, ameaçou pular da janela do alto do edifício da Delegacia Regional do Trabalho, onde em “mesa redonda” acabou sendo assinada a carta dos compromissos.

O episódio se repete em 1993. A morte de Carlos Alberto Miranda Vieira, um dos operários da RHODIA, desperta novamente os demais para o problema de intoxicação. Dessa a vez a intoxicação seria por HEXACLOROBENZENO, resíduo da produção de Tetracloreto de Carbono e Percloroetileno. A princípio por conta própria e depois com a ajuda do Sindicato local, os trabalhadores da RHODIA se submeteram a exames de sangue. Dos 159 indivíduos que trabalhavam na unidade de Cubatão, 117 tem quantidades que variam entre 3 e 16 ug/dl de HCB no sangue e os outros, até 3 ug/dl.

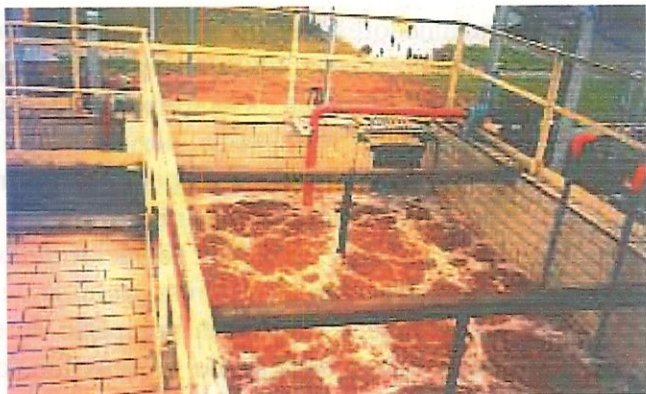
Mais uma vez a empresa se defende alegando que não há correlação cientificamente comprovada entre a presença de hexaclorobenzeno no organismo humano e o desenvolvimento de moléstias crônicas. Essa alegação, cinicamente sustentada pela RHODIA em matéria paga, publicada pelo jornal santista “A Tribuna “, desrespeita toda literatura científica mundial que documenta sobejamente ser o hexaclorobenzeno causador de lesões hepáticas, neurológicas e dermatites entre outros.

Não é difícil compreender como ocorreu a contaminação desses trabalhadores. O Sindicato preparou um dossiê fotográfico sobre a fábrica e o incinerador da planta de Cubatão da RHODIA. Nas fotos vê-se vazamentos e emanções, equipamentos quebrados e não substituídos, dutos e canaletas que despejam resíduos sem tratamento para o rio Perequê e ainda um operário submerso em uma nuvem química enquanto faz a drenagem de resíduos para tambores.

Recentemente, em vistoria requerida pelo Ministério Público, a CETESB recolheu amostras de solo do terreno da fábrica, que foram encaminhadas aos laboratórios do órgão. O resultado das análises registra a presença de 1.830 microgramas/kilo de pentaclorofenol e 374.000 microgramas de hexaclorobenzeno, o que faz do terreno, sobre o qual está instalada a fábrica, um imenso “lixão químico”, ao qual seus trabalhadores estão expostos. Essas análises fazem parte do Inquérito Civil instaurado pelo Ministério Público.



**Foto 2 - Vazamento da bomba J-1211
A/B um verdadeiro coquetel de
substâncias organocloradas**



**Foto3 - Tanque receptor de água de toda
a área, a água é constantemente escura
com forte cheiro de solventes clorados.**

INTERDIÇÃO JUDICIAL DA UNIDADE QUÍMICA DE CUBATÃO - RHODIA.

No dia 05 de fevereiro de 1.993, uma denúncia ao Ministério Público indicava que no interior da unidade química da Rhodia existia um fosso de escavação contendo material poluente.

Verificou-se que o local em questão apresenta grau de contaminação por produtos químicos incompatível com a vida humana e passível de promover graves danos à qualidade do meio ambiente, particularmente aos recursos hídricos (lençol freático).

Na verdade a escavação encontrada servia para uma inadequada disposição de materiais altamente tóxicos, os resíduos sólidos industriais - RSI, gerados no processo de produção da unidade.

Como vimos, os RSI são compostos por produtos químicos altamente perigosos sendo o principal o Hexaclorobenzeno, além do Hexaclorobutadieno, do Pentaclorobenzeno e do tetraclorobenzeno entre outros, substâncias estas mundialmente condenadas em razão da altíssima nocividade ao meio ambiente, causadoras de inúmeros males à saúde e à vida dos seres vivos, entre eles o câncer e graves eventos de intoxicação.

No que concerne à prevenção do câncer, a bibliografia internacional especializada alerta para os graves perigos do Hexaclorobenzeno e do Hexaclorobutadieno através da edição de manuais que tem o objetivo de fornecer subsídios para sua adequada manipulação, patrocinados por entidades de grande respeitabilidade mundial.

Causa grave preocupação a alta concentração de RSI mal dispostos no local, que é infinitamente superior aos limites internacionalmente aceitos para o meio ambiente.

Dai se afirmar que há absoluta incompatibilidade com a vida humana

Para se ter uma idéia acerca dos parâmetros internacionais que, observe-se, não são padrões, mas recomendações (face às incontáveis utilizações dadas a cada solo), há países como a Alemanha, não muito exigente, que admitem um limite de Hexaclorobenzeno de 50.0 ppb (partes por bilhão) em jardins e áreas de recreação. A Suíça, mais restritiva, aceita 10.0 ppb, não admitindo-se a utilização da área para plantio, pastagens e recreação.



Foto 4 - Drenagem de resíduo para tambores. Temperatura de 200°C e liberando muitos gases para a atmosfera. Essa drenagem é feita 3 a 4 vezes durante 6 horas de trabalho.

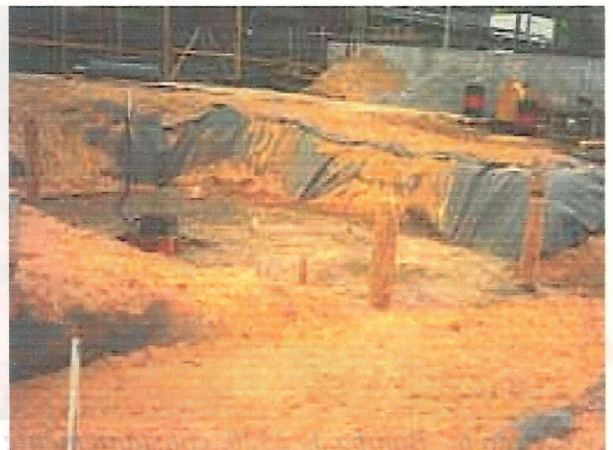


Foto 5 - Escavações para construção de tanque para estocagem de Ascarel (óleo de transformadores elétricos rico em PCBs) cuja incineração a Rhodia pretendia explorar comercialmente. Apesar da proibição da CETESB, a empresa efetuou clandestinamente, à noite, uma incineração experimental.

No que tange à quantidade de RSI encontrada no interior da Rhodia, na porção de solo removida, verificou-se que o Hexaclorobenzeno comparado às recomendações da Alemanha eram 15.340 vezes maior que os 50.0 ppb do padrão alemão.

Pelo que vemos os níveis de concentração de produtos tóxicos no interior da Rhodia atingem níveis críticos. É de se ressaltar a conduta extremamente reprovável da filial da RHÔNE-POULENC, uma vez que durante muitos anos ocultou de toda a sociedade a existência desse fato criminoso, em prejuízo da qualidade de vida dos indivíduos que entraram em contato com aquele ambiente hostil.

E para realçar a gravidade da questão existem inúmeras ações públicas e medidas cautelares contra a Rhodia. Inclusive uma ação sob o número 275/92 que obriga a RHODIA a prospectar toda a região para a localização dos depósitos clandestinos de produtos organoclorados de sua responsabilidade. Mesmo com esta ação a RHODIA ocultou a contaminação na sua própria Unidade Química de Cubatão.

A RHODIA ocultou este fato devido ao dispêndio de somas vultosíssimas de dinheiro a que seria obrigada a dispôr para a solução adequada do problema, além de ter sua imagem comprometida perante a opinião pública.

A gravidade do problema, onde se verifica a absoluta impossibilidade para a coexistência da vida humana no local, é apontada através do fato de que todos os empregados da RHODIA estão contaminados pelo Hexaclorobenzeno, inclusive com o óbito de sete funcionários até agora, somente após a interdição.

No dia 7 de junho de 1.993, a Justiça de Cubatão determina a pronta e total interdição da Unidade Química Cubatão da Rhodia.

A unidade está interdita até hoje - abril de 1997 - há quase quatro anos.



Foto 6 - Bomba J- 2320, constantemente parada, ficou 1 ano fora de operação. Quando chove, é insuficiente para a drenagem, transbordando para o rio.

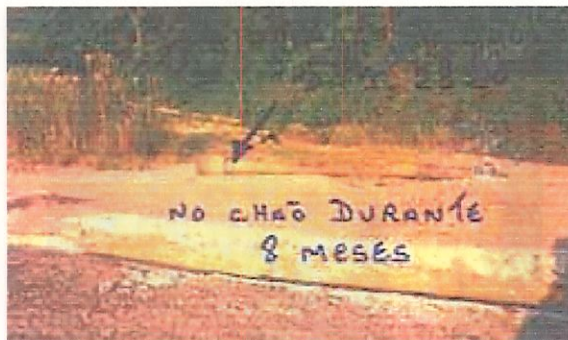


Foto 7 - Prova do descaso na manutenção dos equipamentos: linha de sucção da J- 2320 no chão durante 8 meses.

A FÁBRICA FECHADA - COMEÇA UMA NOVA ETAPA DA LUTA.

O fechamento de uma fábrica da maior transnacional da indústria química do Brasil, a RHODIA / RHÔNE-POULENC, uma das maiores do mundo, e ainda mais, num pólo estratégico para a economia nacional, foi um acontecimento e uma vitória históricos para o movimento sindical, o movimento popular, a sociedade organizada enfim.

Foram 20 anos de luta ininterrupta, persistente e desigual, entre trabalhadores (com infra-estrutura e recursos financeiros precários para sustentá-la) e a RHODIA / RHÔNE-POULENC (com poder econômico e nível de influência altíssimo junto ao governo brasileiro, ao Itamaraty, ao Ministério da Saúde - como a maior fornecedora de remédios, aos centros de poder).

O objeto do litígio foi a violação contumaz das leis trabalhistas e ambientais brasileiras e, em última instância, a transgressão progressiva dos princípios elementares da civilização por parte da transnacional francesa. -DEZENAS DE MORTOS; -40 MIL CONTAMINADOS; -2 MILHÕES DE METROS QUADRADOS DE SOLO E DE ÁGUA CONTAMINADOS; -300 MIL TONELADAS DE LIXO QUÍMICO POLUENTE; -CUSTO ESTIMADO DE 1 BILHÃO E MEIO DE DÓLARES PARA REPARAÇÃO DOS DANOS.

Só na recuperação das áreas contaminadas de um único município atingido - São Vicente, a RHODIA / RHÔNE-POULENC terá de dispensar 1 bilhão de dólares, conforme cálculo do engenheiro ambiental Werner Eugênio Zulauf, ex-gerente da CETESB, órgão de controle ambiental do estado de São Paulo e atual Secretário do Meio Ambiente da cidade de São Paulo. O engenheiro Zulauf conhece a fundo o "CASO RHODIA" e o acompanha há pelo menos 15 anos.

Só agora iniciam-se os primeiros monitoramentos epidemiológicos para avaliar a extensão da contaminação da população por organoclorados. Os especialistas suspeitam um número em torno de 40 mil moradores, só na área continental de São Vicente.

O volume de 300 mil toneladas de material contaminado não é definitivo. Os fatores naturais e antrópicos aumentam, dia a dia, a pluma de contaminação no solo, no aquífero e no lençol freático.

Enfatize-se que, na atual legislação ambiental brasileira - uma das mais completas do mundo, antes mesmo da proteção à natureza, o sujeito da proteção legal é o cidadão. Abordada com propriedade na afirmação de Berlinger, G - In "Medicina e Política":

" O conceito de proteção à natureza implica no reconhecimento de que a primeira natureza violentada na sua integridade é a natureza do homem e, sobretudo, a dos operários."

O Ministério Público e a Curadoria do Meio Ambiente, responsáveis pelo fechamento legal da fábrica, obrigaram a ré RHODIA a dar garantias integrais de emprego por 4 anos e a arcar com os custos da avaliação e tratamento médico pela vida inteira, aos 156 operários afastados pelo fechamento.

Estão em curso ações civis e em elaboração ações criminais contra a RHODIA e os diretores responsáveis, incluindo Edson Vaz Musa, ex-presidente da Rhodia e executivo da RHÔNE-POULENC.

ACPO - ASSOCIAÇÃO DOS CONTAMINADOS PROFISSIONALMENTE POR ORGANOCLORADOS

Em todo esse processo prolongado da demanda contra a RHODIA, foi se estruturando uma associação que centralizasse e assumisse a autoria e coordenação das diversas ações contra a RHODIA.

A ACPO, entidade jurídica com status de entidade pública e sem fins lucrativos está iniciando processo de ampliação e estruturação para associar trabalhadores contaminados com substâncias organocloradas das fábricas da RHODIA em âmbito do Brasil. Posteriormente, estuda-se a possibilidade da fusão jurídica com as entidades que congregam a população do entorno das fábricas, também contaminadas.

A característica marcante e definidora da ACPO é sua origem de base, uma extração realmente trabalhadora, de consciência de cidadania emergente face as relações de produção impostas por uma multinacional como a RHODIA em uma ditadura militar, e que provocou este tipo de seqüela, a devastação da saúde humana e da natureza.

Embora pareça pretensioso, o projeto de ampliação da ACPO fundamenta-se em oportunidades concretas, em situações limites vividas pela classe trabalhadora

brasileira diante da imposição vigorosa do neo-liberalismo pela elite empresarial dominante.

Para atingir este objetivo a ACPO, amparada pelos Sindicatos dos Químicos de São Paulo, ABC e Paulínia, e outras entidades sindicais, ambientalistas e populares já realizou o:

I ENCONTRO ESTADUAL DOS TRABALHADORES E VÍTIMAS DA RHODIA AMERICANA - SÃO PAULO / BRASIL 10 À 11 DE DEZEMBRO DE 1.994

I ENCONTRO NACIONAL DOS TRABALHADORES E VÍTIMAS DA RHODIA SANTOS - SÃO PAULO / BR 31 DE MARÇO, 1 E 2 DE ABRIL DE 1.995

A ACPO organiza manifestações periódicas de reflexão e protestos, passeatas, publicações e exerce pressão permanente junto ao governo Federal, o Congresso Nacional, o Poder Judiciário, e as entidades internacionais mais representativas da defesa do Meio Ambiente e dos Direitos Humanos.

Face ao exposto, encarecemos a participação e a solidariedade, a ajuda política e material, das entidades internacionais e das pessoas que acreditam em formas de vida mais humanas e que recusam o avanço ameaçador da barbárie. Fontes : -Relatórios do GREENPEACE; -Fórum Permanente de Saúde e Meio Ambiente da Baixada Santista; -Dossiê "O CASO RHODIA"; -Imprensa nacional.

atualizada em 30/11/97

nº de vsugestões, contribuições ou informações:

ACPO - Associação dos Contaminados Profissionalmente por Organoclorados

CGCMF 00.034.558/0001-98 - fundada em 03/11/94

contribuições: Banco Itaú (341) - agência 0447 - conta corrente 52.022-2

R. Júlio de Mesquita, 148 - cj. 202 - 11.075-220 - Santos - SP - Brasil

tel. (013) 232 5891

Assessoria Jurídica:

Escritório de Advocacia "Dr. Luiz Eduardo Greenhalgh"

Interlocutora: Dra. Michael Mary Nolan

tel. (011) 871 0708